

## METHOD AND APPARATUS FOR ISOLATING RNA

**Publication number:** JP2005151975 (A)

**Also published as:**

**Publication date:** 2005-06-16

 US2005026175 (A1)

**Inventor(s):** ROBBINS CLAUDIA A; LINK JOHN; BOYES BARRY E;  
TAYLOR RHONDA +

**Applicant(s):** AGILENT TECHNOLOGIES INC +

**Classification:**

**- international:** C12N15/09; C12M1/00; C12N15/10; C12N15/09; C12M1/00;  
C12N15/10; (IPC1-7): C12N15/09; C12M1/00

**- European:** C12N15/10A2

**Application number:** JP20040223037 20040730

**Priority number(s):** US20030631189 20030731; US20030693428 20031024

### Abstract of JP 2005151975 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for isolating a total cellular RNA (tcRNA) from a biological material, capable of decreasing a genomic DNA (gDNA) in a biological sample, without introducing harmful contaminants, nor significantly requiring a time, and to provide a device for the same. ; **SOLUTION:** This method comprises, for example, removing a considerable amount of the gDNA, while maintaining integrity of the RNA in the sample. A preliminary filter column filled with at least one layer formed of glass fiber or borosilic acid fiber is used therein. Further, a tissue/cell-dissolved preparation is prepared, and then the preparation is introduced into the preliminary filter column. When a homogenate passes through the preliminary filter column, the cellular contaminants containing the gDNA remain in the column and, on the other hand, the tcRNA is partially contained in an effluent therefrom. Furthermore, the preliminary filter column is used, before the sample is subjected to an additional purification process or subsequent processes. ; COPYRIGHT: (C) 2005,JPO&NCIP

.....  
Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-151975

(P2005-151975A)

(43) 公開日 平成17年6月16日 (2005. 6. 16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

4 B O 2 4

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

4 B O 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2004-223037 (P2004-223037)	(71) 出願人	399117121
(22) 出願日	平成16年7月30日 (2004. 7. 30)		アジレント・テクノロジーズ・インク
(31) 優先権主張番号	10/631189		AGILENT TECHNOLOGIE S, INC.
(32) 優先日	平成15年7月31日 (2003. 7. 31)		アメリカ合衆国カリフォルニア州パロアル ト ページ・ミル・ロード 395
(33) 優先権主張国	米国 (US)		395 Page Mill Road
(31) 優先権主張番号	10/693428		Palo Alto, California
(32) 優先日	平成15年10月24日 (2003. 10. 24)		U. S. A.
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087642
			弁理士 古谷 聡
		(74) 代理人	100076680
			弁理士 溝部 孝彦
		(74) 代理人	100121061
			弁理士 西山 清春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA単離用の方法と装置

## (57) 【要約】

## 【課題】

核酸を単離するための装置及び方法が開示される。詳細には、細胞トータルRNAの単離について検討されている。さらに、有害な汚染物質を導入せず且つ比較的時間を要さず、生物学的サンプル内のゲノミックDNAを低減させる方法を提供する。

## 【解決手段】

一実施形態では、サンプル内のRNAの完全性を維持しつつ、相当量のgDNAを除去する方法が開示される。この実施形態では、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも一つの層が充填されている予備濾過カラムが使用される。この実施形態では、組織/細胞溶解調製物が調製され、該調製物は予備濾過カラムに導入される。予備濾過カラム中をホモジェネートが通過する際、gDNAを含む細胞汚染物質はカラム内に残り、一方、流出物には部分的にtcRNAが含まれる。一態様では、サンプルに対してさらなる精製プロセス又は後段のプロセスを実施する前に、予備濾過カラムを使用することができる。

## 【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ゲノミック DNA を実質的に含まない RNA サンプルを調製する方法であって、

- (a) 生体サンプルから組織 / 細胞溶解物を形成するステップと、
- (b) 実質的に全ての gDNA を除去するステップと、
- (c) 前記 (b) の調製物に有機溶媒を加えて、沈殿物を形成させるステップと、
- (d) 前記 (c) の沈殿物を、膜を含む RNA 単離膜カラムに接触させるステップと、
- (e) 前記膜から、前記ゲノミック DNA を実質的に含まない沈殿物を収集するステ

ップと、

を包含する方法。

10

## 【請求項 2】

前記膜が、ポリマー膜である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ステップ (b) の実質的に全 gDNA を除去するステップが、予備濾過技術を使用することによって達成される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記溶解物が、カオトロピック剤を含む溶解バッファーを用いて形成される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記カオトロピック剤が、グアニジンイソチオシアネート、アンモニウムイソチオシアネート、塩酸グアニジン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記カオトロピック剤の濃度が、約 0.5 M ~ 約 5.0 M である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記生体サンプルが、動物及び植物の組織及び / 又は細胞からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記動物の組織及び / 又は細胞が、血液、尿、毛髪、皮膚、筋肉、骨、体液、臓器抽出物などからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記ステップ (e) の後に、デオキシリボヌクレアーゼ処理を実施する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記沈殿物が、実質的に DNA を含まない RNA からなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記溶解物が、βメルカプトエタノールを含む溶解バッファーを用いて形成される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記有機溶媒が、メタノール、エタノール、イソプロパノール、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアルコールである、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記ステップ (d) の後に、前記沈殿物を有機溶媒を含む洗浄溶液により洗浄する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記洗浄溶液が、洗浄バッファー # 1 及び洗浄バッファー # 2 からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記洗浄バッファー # 1 が、

50

- (a) 約 0.2 M ~ 約 2 M のグアニジンと、
  - (b) 約 5 % ~ 約 25 % のエタノールと、
  - (c) pH を約 6 ~ 約 9 に維持するバッファー剤と、
- からなる、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記洗浄バッファー # 2 が、

- (a) 約 40 % ~ 約 90 % のエタノールと、
  - (b) pH を約 6 ~ 約 9 に維持するバッファー剤と、
- からなる、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 17】

ゲノミック DNA を実質的に含まない RNA サンプルを調製する方法であって、

- (a) 生体サンプルから組織 / 細胞溶解物を形成するステップと、
- (b) ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも 1 つの層を有するファイバー材を備える予備濾過カラムに、前記溶解物を接触させるステップと、
- (c) 前記ステップ (b) の流出物に有機溶媒を加えて沈殿物を形成させるステップと

、

- (d) 前記ステップ (c) からの調製物を、膜を備える RNA 単離膜カラムに接触させるステップと、

- (e) 前記 RNA 単離膜カラムから、ゲノミック DNA を実質的に含まない沈殿物を収集するステップと、

を包含する方法。

## 【請求項 18】

前記ファイバー材が、約 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 約 10  $\mu\text{m}$  の範囲の粒子を保持する能力を有する、請求項 4 又は 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記ファイバー材が、約 50  $\mu\text{m}$  ~ 約 2000  $\mu\text{m}$  の範囲の厚さを有する、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記ファイバー材が、約 75  $\text{g} / \text{m}^2$  ~ 約 300  $\text{g} / \text{m}^2$  の範囲の比重を有する、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記 RNA 単離膜が、BTS、PVDF、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスルホン、MMM、PVP、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 2 又は 17 に記載の方法。

## 【請求項 22】

gDNA を実質的に含まない状態で RNA を単離するキットであって、

- (a) ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも 1 つの層を有するファイバー材を備える、少なくとも 1 つの予備濾過カラムと、

- (b) 膜を含む少なくとも 1 つの RNA 単離膜カラムと、

- (c) 前記 (a) 及び (b) のための試薬と、

- (d) 前記 (a) から (c) までを実施するための説明書と、

からなるキット。

## 【請求項 23】

前記 RNA 単離膜が、BTS、PVDF、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスルホン、MMM、PVP、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 2、19 又は 22 の何れか一項に記載のキット。

## 【請求項 24】

前記試薬が、少なくとも 1 つの有機溶媒と溶解バッファーを含む、請求項 22 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、概して、核酸のような生体物質を単離するための装置と方法に関する。より詳細には、本発明は、生体物質から細胞トータルRNAを単離することに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ハイブリダイゼーションアレイなどの遺伝子発現技術、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、クローニング、制限分析、配列決定をはじめとする多くの分子生物学的技術では、高純度の完全なRNAを投入する必要がある。RNAは、実験手順に干渉する可能性のある汚染物質を実質的に含まないものでなければならない。このような汚染物質としては、分子生物学で採用される、核酸もしくはタンパク質のハイブリダイゼーション、酵素触媒反応、及びその他の化学反応を阻害又は抑制する物質、目的の核酸又は他の生体物質の分解もしくは解重合を触媒する物質、分析されているサンプルに実際には存在していないのに、一定量のターゲット生体物質(例えば核酸)がサンプル内に存在すると示す、「バックグラウンド」を与える物質、が挙げられる。他の汚染物質としては、酵素、他の種類のタンパク質、多糖、ポリヌクレオチド、及び脂肪、又は低分子量酵素阻害剤、オリゴヌクレオチドなどの低分子量物質を挙げることができる。汚染物質はまた、対象とする物質を単離するために用いる化学物質又は他の物質からも系内に導入され得る。この種の汚染物質としては、微量金属、染料、有機溶媒が挙げられる。さらに典型的には、核酸は、組織、体液、培養物中の細胞、ターゲット核酸の増幅を行ったアガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル又は溶液などの複体系内に存在するため、核酸の単離は困難である。

## 【0003】

従って、後段の分子生物学的技術で利用できる程度に高純度且つ完全なRNAを調製するためには、多くの場合、ステップ数の多い大変なプロセスを必要とし、且つ従来の核酸単離プロセスには重大な欠点がある。このような欠点とは、フェノール(既知の発がん性物質)などの毒性のある化学物質、クロロホルム(非常に揮発性が高く毒性且つ可燃性である)などの揮発性の試薬などを使用する有機抽出ステップが含まれていること、並びに現在の方法は、オートメーション化又は高スループット化が困難なことである。さらに、有機溶媒抽出法を使用する場合には、規制対象であり、環境に配慮した方法で廃棄しなければならない有機性廃棄物が生じる。他の欠点は、所与の核酸材料を単離するために必要とされる抽出ステップの数が多く、時間を要することである。従って、理想的な環境及び条件下であっても、ほとんどの従来の核酸単離方法は、時間を要し、危険で、しかも単離される核酸物質の収率が比較的低いといった問題を有していた。

## 【0004】

上述のような従来の単離技術に取って代わるものとして、又は従来の単離技術を補足するものとして開発された市販の単離システムにおいては、多くの場合、核酸結合基材として珪酸ファイバー又はガラスファイバーからなるフィルタが使用されている。核酸は、ガラススラリーや珪藻土などのシリコン含有物質に結合することがよく知られている。これらの物質のいくつかが抱える問題点は、必要な珪酸材料が常に適切な形態で市販されているわけではないこと、また、多くの場合、オンサイトで調製しなければならないため、核酸単離手順に時間と手間を要することである。

## 【0005】

少なくとも数種の生体物質からトータルRNAを単離するために使用し得る、シリカベースのシステム及び方法もまた、ここ数年の間に、既に開発されている。それら既知のシリカベースのRNA単離技術では、同一の基本的な一連のステップに基づいて、任意の所の生体材料からターゲットRNAが単離される。とはいえ、各手順で用いられる種々の溶液の濃度及び量は、使用するシリカベースの材料組成によって変更される。一般に、それら既知の全てのシリカベースRNA単離プロセスにおいて用いられる基本的な一連のステップには、溶解バッファー存在下で生体物質を分解するステップ、核酸(複数可)と「

シリカベースの基質」との複合体を形成するステップ、得られた複合体から溶解バッファ一混合液を除去し複合体を洗浄するステップ、複合体からターゲットの核酸を溶出させるステップが包含される。一般に、「シリカベース」という用語は、 $\text{SiO}_2$ 化合物、及びこれと同類の水和酸化物を記述するために用いられる。

【0006】

近年、核酸をシリコンカーバイド粒子に結合するステップ、次いで核酸をシリコンカーバイドから溶出させるステップを含む、DNA及びRNAの精製方法も開発されている。ここで、シリコンカーバイドは、上記のような「シリカベース」ではなく、「シリカベース」として定義されるどの組成物にも含まれないことに注意されたい。

【0007】

市販の種々のキットによって、種々の生体物質からDNA又はRNAを単離する比較的迅速な手段がもたらされるが、特にRNAを生体源から単離する場合には、シリカベースの核酸単離キットを使用することには限界のあることが知られている。特に少数の細胞からのサンプルを処理する場合、又は、哺乳類の脾臓組織、脾臓組織、肺組織など一部の困難な組織からRNAを単離する場合などには、それら複雑な生体サンプル内のRNA純度は低く、完全なRNAの回収は困難である。

【0008】

RNA単離における一般的な汚染物質は、ゲノミックDNA (gDNA) である。一部の市販のRNA単離キットは、デオキシリボヌクレアーゼI (DNase I) を用いて、選択的に汚染物質であるgDNAを酵素の働きにより除去するプロトコルを提供している。しかしながら、DNase I処理を実施すると、商業生産されているDNase Iにはリボヌクレアーゼ (RNase) が混在している可能性があるため、RNAの収率が低下し、RNAの質が低下し得る。また、DNase I処理を用いると、実験時間が長くなり、処理に必要な時間が延長される。さらに、DNase I処理は、後段のプロセスと干渉しかなない金属イオンの添加を必要とする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

よって、実施手順全体に要する時間があまり長くなり、特殊な処理が必要となる危険な廃棄物を生成せず、タンパク質、脂質、gDNA、又は後段の処理もしくは解析を阻害、干渉する可能性のある任意の化学物質などの汚染物質を実質的に含まない単離RNAをもたらし、容易で、迅速で、安全な方法及び装置が必要とされている。さらに、非シリカベース材料を用いて核酸を濃縮及び単離する方法であって、現在の非シリカベースの方法よりも高いRNA収率をもたらし、容易で、迅速で、安全で、効果的な方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一実施形態では、サンプル内のRNAの完全性を維持しつつ、相当量のgDNAを除去する方法が開示される。この実施形態では、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも1つの層が充填されている予備濾過カラムが使用される。この実施形態では、組織/細胞溶解調製物が調製され、該調製物は予備濾過カラムに導入される。予備濾過カラム中をホモジェネートが通過する際、gDNAを含む細胞汚染物質はカラム内に残り、一方、流出物にはある程度精製されたtcRNAが含まれる。一態様では、サンプルに対してさらなる精製プロセス又は後段のプロセスを実施する前に、予備濾過カラムを使用することができる。

【0011】

他の実施形態では、複雑なサンプル基質から核酸を単離する方法が開示される。本発明の特定の実施形態では、核酸はRNAである。この方法では、カオトロピック剤によりサンプル基質が破壊される。次いで、tcRNA単離をはじめとする後段のプロセスを最適化するため、有機溶媒がサンプルに加えられる。次に、この調製物を、例えばシリコンカ

10

20

30

40

50

ーバイドカラムなどの本発明のカラムに導入することができる。特定の実施形態では、カラムはシリコンカーバイドウイスカー(「SiCw」)カラムである。調製物がカラムを通過して流出した後に、その流出調製物を洗浄することによって、カラム内に残留することなく流出物中に混在している汚染物質を流出調製物から除去し得る。最終的に、所望の核酸製品をカラムから溶出させ単離することができる。

#### 【0012】

他の実施形態では、予備濾過カラムと、SiCw又は「シリカベース」カラムなどの単離カラムとを共に用いて、核酸を単離する。本実施形態では、組織/細胞溶解物を調製し、次いで予備濾過を実施する。この予備濾過ステップでは、予備濾過スピンカラムを使用する。予備濾過スピンカラムの例としては、限定はしないが、ガラスファイバークラム又はホウケイ酸カラムが挙げられる。この実施形態の一態様では、gDNAが予備濾過カラム基材中に残り、RNAが流出する。さらに、流出物中のRNAをDNaseを用いて処理し、予備濾過ステップで完全に除去されなかったDNAを分解することができる。RNA含有流出物を単離カラムにかけ、流出物からRNAを精製する。任意に、単離カラム内に捕獲されているRNAをデオキシリボヌクレアーゼ処理することにより、gDNAを除去することができる。いずれの場合でも、次いで、RNAを少量溶出させることができる。

10

#### 【0013】

さらに別の実施形態では、本発明はシリコンカーバイドからなる装置に関する。特定の態様では、サンプル基質から核酸を単離するための核酸結合カラムとしてSiCwカラムを用いる。一態様ではSiCwがRNAと結合する。

20

#### 【0014】

本発明の一実施形態では、注入口、排出口、及び注入口と排出口の間にあるチャンバを備えるRNA単離膜カラムが開示される。チャンバの中には、ポリマー膜からなる単一又は複数の層がある。ポリマー膜の例として、ポリスルホン、PVDF、BTS、ナイロン、ニトロセルロース、PVP(ポリ(ビニルピロリドン))、及びそれらの混合物が挙げられる。当該RNA単離カラムは、さらに、固定リングとフリットを備え、これらは両方とも膜の周囲に配置されている。固定リングは注入口近傍に配置され、フリットは排出口近傍に配置される。

30

#### 【0015】

本明細書では、当該RNA単離膜カラムを用いるRNAの単離法もまた開示される。まず、サンプル基質を調製する。サンプル基質は、動植物の組織及び細胞を含み得る。組織及び/又は細胞は、当分野で周知の方法を利用して、生物から得ることができる。その調製物を溶解させ、組織及び細胞内部の成分を露出及び/又は放出させる。一態様では、溶解調製物を予備濾過カラムにかけることができる。好ましくは、カラムを遠心分離するか又は真空にして、溶解物をガラスファイバークラムからなる予備フィルタカラムを通過させる。この遠心分離の間、「層」は形成されない(即ち、ベレットは生じない。即ち、相分離は起こらない)。遠心分離後、アルコールを調製物に添加することができる。アルコールを含む調製物を、本発明のRNA膜単離スピンカラムに導入(装填)することができる。カラムは、例えばMMM膜のような少なくとも1つのポリマー膜を含む。前記アルコール含有調製物をカラムに導入したら、遠心分離する。フロースルー(カラムに吸着しなかった物質)を廃棄し、スピンカラムを少なくとも1回洗浄する。元のサンプル基質由来のRNAを、ヌクレアーゼフリー水又は他の温和な低イオン強度溶液を用いて溶出させることができる。

40

#### 【0016】

キットもまた、本発明の一実施形態である。本発明のキットは、少なくとも1つの予備濾過カラムを含む。一態様では、予備濾過カラムは、ガラスファイバークラム又はホウケイ酸ファイバークラムなどのファイバークラムから構成されている。キットはまた、少なくとも1つのRNA単離膜カラムを含む。試薬もまた、本実施形態のキットの一部である。当該試薬には、少なくとも1つの有機溶媒と少なくとも1つの溶解バッファーとが含まれる(上述した溶

50

解バッファーなど)。他の試薬をキット内に含めることもできる。このような試薬には、膜で単離したRNAを洗浄し、さらに汚染物質(コンタミネント)を除去するか、t c RNAを収集する間に、残存する溶解試薬の濃度を低減させるために用いられる試薬が含まれ得る。実験者が本発明を実施するための説明書も含まれている。

#### 【発明の効果】

##### 【0017】

本発明によれば、核酸、特に細胞トータルRNA(t c RNA)を単離する装置及び方法を提供することができる。さらに、本発明によれば、有害な汚染物質を導入することなく、またサンプルに対して実施する手順全体に要する時間をそれほど延長させることなく、生体サンプル内のg DNAを低減させる、装置及び方法を提供することができる。

10

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0018】

本発明は、核酸を単離するために使用される装置及び方法に関する。特に、本発明はt c RNAの単離に関する。関連する方法では、本発明は、有害な汚染物質を導入することなく、また、サンプルに対して実施する手順全体に必要となる時間をそれほど延長させることなく、生体サンプル内のg DNAを低減させる、装置及び方法に関する。

##### 【0019】

本発明は、複雑なサンプル基質から核酸を単離する方法に関する。本発明の特定の態様では、核酸はRNAである。別の態様では、RNAはt c RNAである。本発明の生体サンプルには、限定はしないが、動物、植物、バクテリアなどの真核生物又は原核生物から得られる細胞及び組織が含まれる。一態様では、動物は哺乳類であってもよく、さらに別の態様では、哺乳類はヒトであってもよい。例えば、植物、イースト菌、真菌、ウイルスなど他のサンプルも考え得る。さらに、サンプルは、例えばポリメラーゼ連鎖反応又は酵素重合反応などの実験プロトコル由来の生成物、アガロースゲルなどの培地に存在する核酸などであってもよい。サンプル基質は、単一鎖又は二重鎖のRNA及びDNAなど、単一鎖又は二重鎖の核酸を含んでいてもよい。また、変性された核酸も本発明の範囲に包含される。

20

##### 【0020】

本発明の予備濾過法及び装置では、g DNA汚染物質を除去するだけでなく、同時にサンプルをホモゲナイズ(均質化)する。g DNA除去とホモゲナイズとを同時に実施することは、通常は溶解とホモゲナイズとが、パワーホモゲナイズ処理などの単一ステップでは完了しないサンプルにとって、特に有利である。例えば、細胞培養物は、典型的には、当分野で既知の溶解溶液により、細胞培養容器又はチューブ内で溶解する。溶解した細胞培養液サンプルのホモゲナイズに失敗すると、サンプルの粘性が高まり、RNAの収率が低下又は変化し得る。従って、本発明の溶解とホモゲナイズとを同時に行う処理によって、他のホモゲナイズステップの必要性、並びにホモゲナイズステップの不実施に伴う問題、を回避することができる。

30

##### 【0021】

本発明の方法により、高度に精製された完全な細胞トータルRNA(t c RNA)が得られる。精製されたt c RNAとは、サンプル基質由来の汚染物質、並びにプロセス由来の汚染物質が本質的に完全に除去されたt c RNAと定義される。これらの汚染物質には、カオトロピック塩、非カオトロピック塩、アルコール、g DNA、タンパク質、脂質、糖質、その他の細胞の残骸が含まれる。汚染物質の検出アッセイとしては、限定はしないが、電気泳動法、分光光度法、PCR又は逆転写などの機能アッセイが挙げられる。

40

##### 【0022】

一般に、核酸単離の最初のステップは、当分野で周知の方法を用いてサンプルを破壊し、サンプル内に含まれる細胞を溶解させることである。本発明の一態様では、単離すべき核酸は、t c RNAである。高純度の完全なRNAの例には、P. ChomczynskiとN. Sacchiによる、「Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanat

50



e - Phenol - Chloroform Extraction」, Anal. Biochem., 162 (1) : 156 - 9 (1987年4月)、及び、Chomczynskiによる米国特許第4,843,155号において説明されている方法が含まれる。これらの内容は、参照すること、本明細書に取り入れることとする。その他の方法として、F. Ausubel他編、「Current Protocols in Molecular Biology」, Wiley - Interscience, New York (1993年)の第2章(DNA)、第4章(RNA)に説明されている方法を挙げることで、参照すること、その内容の全てを本明細書に取り入れることとする。

#### 【0023】

種々の種類の生体材料からトータルRNAを単離する溶解及び有機抽出法の例に関しては、Sambrookらによる、「Molecular Cloning」, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, P. 7.3以下参照(1989); Promega Corporationによる、「Protocols and Applications Guide」, 3<sup>rd</sup> edition, p. 93以下参照(1996); Chirgwin J.M.らによる、18 Biochemistry 5294 (1979)参照。また、従来の技術及びシリカベースの技術に関しては、米国特許第6,218,531号を参照されたい。参照することで、これらの教示内容の全てを本明細書に取り入れることとする。

#### 【0024】

本発明では、1つ又は複数のカオトロピック塩を使用する。カオトロープには、例えば、グアニジンイソチオシアネート、アンモニウムイソチオシアネート、グアニジン塩酸塩を用いることができる。当業者であれば、他のカオトロープも本発明の範囲内で使用できることが理解されよう。典型的には、カオトロープの濃度は、約0.5M-約5.0Mの範囲である。重ねて、これらの濃度は、当業者には既知の、サンプル基質などの要因に応じて変更することができる。カオトロピック剤は、例えば、タンパク質を変性させるために、又は、分子間の相互作用を抑制するために、又は、重要なことには、スクレアーゼ(存在すると、対象とする核酸を劣化させてしまう)の作用を抑制するために、用いられる。いくつかの方法を用いて、プロセス全体にわたる核酸の完全性をモニタリングすることができ、その最も一般的な方法は、電気泳動法やRT-PCRアッセイである。

#### 【0025】

ホモジェネートは、当業者に周知の方法によりサンプル基質を破壊し、サンプル基質に含まれる細胞を溶解させることで形成される。当該ホモジェネートは、さらに処理することができる。

#### 【0026】

さらなる処理の例には、シリコンカーバイド粒子を用いて核酸を単離する方法に関して説明している、Haj-Ahmadによる米国特許第6,177,278号及び第6,291,248号に記載の処理が含まれる。参照すること、これらの特許の記載内容の全てを本明細書に取り入れることとする。Haj-Ahmadが説明している、核酸単離法では、比較的低い比表面積( $m^2/g$ )のシリコンカーバイド粒状物、即ち、無孔性の、不規則な形状を有する粒子の集合が使用されている。

#### 【0027】

シリコンカーバイドの代替物として、ガラス粒子、ガラス粉末、シリカ粒子、ガラスマイクロファイバー、珪藻土、及びこれらの化合物の混合物、のようなシリカ材料を、カオトロピック塩水溶液と組み合わせて使用することで、核酸を単離する。

#### 【0028】

Haj-Ahmadが開示した方法とは対照的に、本発明の方法は、溶解調製物を予備濾過スピンカラムに導入し、精製ホモジェネートを得るステップを包含する。溶解溶液は、好ましくは、カオトロピック塩、及び/又はターゲット核酸の分解や収率低下を防止する添加物を含む。一態様では、予備濾過カラムは、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーカラムである。一態様では、本発明のファイバーには、結合剤は含まれない。結合

10

20

30

40

50

剤を含まないファイバーの例は、「純水ウケイ酸」である。別の態様では、使用するファイバーは結合剤を含んでいてもよい。結合剤を用いることで、固相の濾過剤の取り扱いが容易になる。結合剤はまた、複合材料の特性を変性させるために採用されたプロセスの結果存在することもある。このようなプロセス要素は、ターゲット核酸の最適収率及び純度にとの適合性に応じて選択しなければならない。このような結合剤の例として、限定はしないが、アクリル、アクリル樹脂、又はプラスチック樹脂が挙げられる。結合剤は、典型的には、ファイバーフィルタ重量の5%を占めるが、この割合は変更し得る。

【0029】

本発明の他の態様では、有機溶媒が添加される。例えば、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどの低分子量アルコールを、容積で約50%~80%添加する。当該有機溶媒によって、ターゲット核酸の純度が向上したり、及び/又は回収率が向上する。

【0030】

予備濾過ステップでは、gDNA及び他の汚染物質がスピнкаラム中に残留し、所望のRNAは流出物中に含まれる。任意に、この流出物をDNaseで処理することで、カラム内に残留することなく流出物中に混在しているDNAが分解される。

【0031】

本発明のファイバーフィルタ材は、約0.1 $\mu\text{m}$ ~約10 $\mu\text{m}$ の直径に相当する粒子保持能を有する。本発明のファイバー材の厚さは、約50 $\mu\text{m}$ ~約2000 $\mu\text{m}$ の範囲とし得る。例えば、典型的なファイバーフィルタの厚さは、約500 $\mu\text{m}$ である。ファイバーフィルタの比重は、典型的には、約75g/m<sup>2</sup>~約300g/m<sup>2</sup>の範囲である。複数のファイバー層からなる実施形態もまた、本発明の範囲内である。

【0032】

図1に、本発明の典型的なSiCwカラムの一例を示している。この図には、中にフリット22が配置されているスピнкаラム20を示している。フリット22上には、シリコンカーバイドウィスカー24が配置されている。材料を固定するために、また、シリコンカーバイドウィスカー24が過剰に膨潤するのを防ぐために、シリコンカーバイドウィスカーの土台に隣接して固定リング26が配置されている。

【0033】

当該シリコンカーバイドウィスカーは、核酸を単離するために、比較的高い比重を有する。表面窒素吸着法で測定した場合、本発明に用いているSiCwは、3.9g/m<sup>2</sup>/gであり、一方、Ha j - A h m a d の材料は0.4g/m<sup>2</sup>/gである。ウィスカー技術は、複雑なサンプルから、特にRNAなどの核酸を単離することに関して効果的に機能する。本発明の方法と、Ha j - A h m a d により開示された方法との重要な差異は、Ha j - A h m a d が開示したRNA単離プロセスでは、完全なRNAは得られず、gDNAを除去する方法も包含されていないことである。

【0034】

上述のように、SiCwスピнкаラムにサンプルが導入されると、次いで、当該カラムを、遠心分離されることになる収集管内に配置するか、又は真空マニホールド上に乗せることができる。次いで、スピнкаラムをマイクロ遠心分離機で遠心分離するか、又はマニホールドを真空にすることで、サンプル調製液がスピнкаラム内のSiCwフィルタを通過し、そして収集チャンバに入る。このとき、予備濾過プロセスで除去されなかった殆どの核酸、即ちRNA及びgDNAは、SiCwスピнкаラム領域に残留する。実施例セクション中の表5及び表6を参照されたい。

【0035】

任意に、サンプル調製物をスピнкаラムに導入するステップの後段ステップとして、汚染物質を除去する洗浄処理と任意選択の酵素処理を実施することができる。例えば、このような処理は、DNase (DNase I 又は II) を用いて実施することができ、サンプル結合後のDNase処理により、残りのgDNA汚染物質を除去することができるが、このような処理が必要とされない場合もある。DNase I が最も一般的に使用されるDNaseであるが、DNase II もまた使用できる。DNase II は、脾臓から

10

20

30

40

50

単離される酵素であって、肝臓から単離されるDNase Iと比較すると、見掛けの分子量、最適pHなどにおいて幾分異なる性質を有しており、異なる塩基を認識し切断するものと考えられる。しかしながら、どちらの酵素も、RNase不含有の状態にて市販されており、このことは、DNase消化後に完全なRNAを得るために重要である。DNase処理を実施する場合は、ホモジネートをカラムに通過させた後、カラムは、例えば少なくとも0.5Mの濃度のグアニジンソチオシアネート、アンモニウムソチオシアネート、グアニジン硫酸塩などのカオトロピック塩と、約5%～約10%のメタノール、エタノール、イソプロパノールなどの低分子量アルコールを含む洗浄バッファー#1により1回洗浄し、次いで、約6～約9のpHに中和することができ。例えば、RNaseフリーDNase含有中和溶液(pH6～9、塩化カルシウム及び塩化マグネシウム(又は硫酸塩、塩化マンガン)を含有している)を、サンプルが結合している基材に添加し、約25℃～約37℃の温度で少なくとも5分間培養する。

10

【0036】

この培養の後、洗浄バッファー#1をカラム内のホモジネートに添加する。次いで、カラムを遠心分離するか、及び/又はカラムを真空にする。

【0037】

洗浄バッファー#1により洗浄した後、25mM、pH7のトリス塩化水素(米国テキサス州オースティン、アンピオン社)と、70%エタノール(米国ミズーリ州セントルイス、シグマ社)とを含んで成る洗浄バッファー#2により2回続けて洗浄することができ。典型的には、洗浄バッファー#2は、例えば、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどの低分子量アルコールを、約50vol%～80vol%含んでいる。

20

【0038】

上記のように、遠心分離及び/又は真空除去のいずれにおいても、洗浄溶液を除去することができ。遠心分離及び/又は真空手順により、カラム材料からアルコールの大部分が除去される。

【0039】

DNase消化を実施しない場合は、サンプルを濾過カラムに通過させた後、洗浄バッファー#1によりカラムを少なくとも1回洗浄し、次いで洗浄バッファー#2を用いて洗浄する。洗浄後、カラムから対象物質を溶出させる。例えば、SiCwカラムを使用する場合には、最後のステップは、単離され精製された核酸、例えばtcRNAを、SiCwカラムから溶出させることである。SiCwカラムから溶出させるのに用いる溶液は、一般に低いイオン強度を有し、100mM未満であり、pHは約6.0～約8.5である。このような溶液の2つの例として、10mMのEDTA及び10mMのクエン酸ナトリウムを挙げることができる。

30

【0040】

さらに、2回目の単離を実施することができ。SiCw(又は他の結合)カラムからの全溶出液に、DNase消化を実施することができ。次いで、異なるカラムを用いて、洗浄ステップを含む精製を実施することができ。溶出後に、DNase消化を実施する場合は、全サンプルを用いて同じ収集管内で実施することができ、又はアリコートを除去することができ。典型的には、類似のバッファー条件下では、溶出後に実施されるDNase反応では、より少ない量のDNase酵素を使用する。溶出後のDNase消化は、37℃にて、溶出前に実施する15分間のDNase消化よりも短い時間実施することができ。EDTAにより反応を終了させることができ、酵素を例えば65℃の熱で不活性化したり、及び/又はフェノール/クロロホルム抽出などをはじめとする追加の精製手順を実施することができ。

40

【0041】

図2は、本発明の予備濾過スピカラム10の典型的な実施形態を示している。本発明の特定の態様では、予備濾過カラムは、ファイバーフィルタ材12からなる少なくとも1つの層(この図では複数の層が図示されている)と、ファイバーフィルタ材の第1の面に隣接して配置されている固定リング14とを備える。固定リング14は、ファイバーフィ

50

ルタ材 12 の層を固定し、サンプルを加えたときにファイバフィルタ材 12 が過剰に膨張するのを防止する。図 2 には、ファイバフィルタ材 12 の第 2 の面に隣接して配置されているフリット 16 もまた描かれている。一態様では、フリット 16 は、細孔径が約  $90\mu\text{m}$ 、厚さが  $1.5\text{mm}$  のポリエチレンから構成される。フリット 16 は、ファイバフィルタ材 12 が変形しないように機械的支持をもたらす機能を有する。

#### 【0042】

本発明の別の態様では、流出調製物を、例えば本発明のシリコンカーバイドウイスカールカラム (図 1) をはじめとするシリコンカーバイドカラムなどの濾過カラムを用いて、さらに精製する。サンプルを本発明のファイバフィルタを用いて予備濾過した後に、サンプルに対して任意の手順を実施することができ、次いで、ホモジェネートを導入した SiCw カラムを遠心分離ユニット内の収集管に入れるか、及び / 又は真空マニホールド上に配置することができる。シリコンカーバイドウイスカールカラムをマイクロ遠心分離で遠心分離するか ( $16000 \times G$  にて  $\sim 2$  分)、及び / 又はマニホールドを真空にすることができ、流出物を SiCw フィルタを通過させて収集チャンバに入れる。目的のターゲット核酸はほとんどシリコンカーバイドウイスカーと結合しカラム内に残留する。特定の態様では、目的の核酸は RNA である。より特定の態様では、RNA は tcRNA である。

#### 【0043】

本発明の方法及び装置を利用する RNA 単離キットの、予めパッケージ化された構成要素又は個別に入手可能な構成要素も、本発明の範囲内である。典型的なキットとして、収集管と共にバックされたファイバフィルタ、収集管と共にバックされた SiCw スピニングカラム、又はプラスチック製品 (実験者がスピニングカラムをバックするのに用いられる) と共にバックされた SiCw スラリー、又は実験者がスラリー化させバックするための乾燥 SiCw、洗浄バッファ #1 及び #2 を含む試薬、エタノールと  $\beta$ -メトカプトエタノールなどのアルコール、溶出用収集管を挙げることができる。キットはまた、DNAse 及び / 又はプロテイナーゼ K と共に準備又は組み立てることができ、キットを構成する構成要素は、別々に入手できるようにすることもできる。

#### 【0044】

本発明の一実施形態では、注入口 32、排出口 34、及び注入口と排出口の間のチャンバ 36 を備える RNA 単離カラム 30 を開示する。チャンバの中には単一の層又は多数の層からなるポリマー膜 38 があり、当該ポリマー膜の例として、ポリスルホン、PVP (ポリ (ビニルピロリドン))、MMM 膜 (ポールライフサイエンス社)、BTS、PVD、ナイロン、ニトロセルロース、及びそれらの混合物が挙げられる。膜は、ポリマーである必要はない。また、固定リング 40 とフリット 42 が、膜 38 の周囲に配置されている。固定リング 40 は注入口 32 近傍に配置され、フリット 42 は排出口 34 近傍に配置される。

#### 【0045】

本発明の 1 つの重要な特徴は、ポリマー膜には、高 pH での溶解又は不可逆的な吸収のような、シリカベースのカラムにみられる限界がないことである。

#### 【0046】

本発明の RNA 単離膜カラム 30 を利用することで、実験者は、「導入」又は「スピニング (又は遠心分離)」毎に、 $5\mu\text{L} \sim 700\mu\text{L}$  のサンプルを注入口 32 を介してカラム 30 に加えることができる。本発明のカラム 30 にサンプルを加える前に、例えばカオトピック剤を用いてサンプル基質を破壊し、遠心分離することができる。必要があれば、実験者は、調製物に 1 種又は複数種の有機溶媒を加えることもできる。例えば、 $25\% \sim 100\%$  のアルコールを、体積比で  $0.25$  から  $1$  の量にて加え、遠心分離することができる。沈殿物は膜によって収集され、遠心分離時に収集管内に収集された「フロースルー」は容易に取り除くことができる。これらの予備的なステップの後に、サンプル調製物を RNA 単離膜カラム 30 に加えることができる。流出物 (フロースルー) をカラム内を通過させ、次いで、洗浄バッファ #2 により洗浄することによって、汚染物質がカラムから容易に除去できる。このプロセスによって、所望の RNA は、1 つ又は複数の膜 38 の表

面に沈殿している。次いで、当分野で周知の方法を用いて、RNAを収集することができる。

#### 【0047】

有機溶媒を加える前に、任意に、サンプル基質を(ガラス又はホウケイ酸)ファイバー予備濾過カラムに導入することができる。これによって、gDNA汚染物質は、市販されているシリカベースのキットを用いる方法より低減される(米国特許出願第10/631,189号参照。参照することで、その内容の全てを本明細書に取り入れることとする)。オンカラムDNase消化を利用すると、gDNAをさらに低減させることができる。この消化は任意選択的に実施され、gDNA低減のために必ずしも必要とされるものではない。汚染物質であるgDNAは、直接定量化PCRアッセイを用いて定量化する。

10

#### 【0048】

本発明の利点として、限定はしないが、ステップ数が少ないためサンプル調製時間を短縮し得ること、溶出容積が少ないため濃縮サンプルが得られること、また例えばガラスファイバー予備濾過カラムを用いてgDNAを予め除去することによってゲノミックDNA(gDNA)汚染が低減されること、が挙げられる。本発明のRNA単離には、フェノールやクロホルムのような毒性物質又は腐食性物質は必要とされないが、実験者がこのような物質を使用することを選択した場合には、このような物質も使用でき、このような態様も本発明の範囲内である。

#### 【0049】

本発明を使用して単離したRNAを、QIAGEN RNeasy Mini Kit(20  
キアゲン社、米国カリフォルニア州バレンシア、部品番号74104)などの市販の方法を用いて単離したRNAと比較した結果を、表1~表4に示している。任意選択のオンカラムDNase消化を実施する場合と実施しない場合について示している。これらのデータから、本発明のカラム及び方法を使用することで、十分に同等な量のRNAが単離され、しかもgDNA汚染が低減されていることが分かる。さらに、単離困難なサンプルに関しても、本発明で得られるRNAは高品質である。これを表す変性アガロースゲルを図4に示している。本発明の方法又はQIAGEN RNeasy Mini Kitを使用して単離された脾臓RNAを、任意選択のオンカラムDNase消化を実施した場合と実施しない場合の両方に関して、図4に示している。レーン1~3は、本発明により得られた標準サンプルであり、レーン4~6は、本明細書に開示した方法を用いてDNase処理されたサンプルであり、レーン7~9は、QIAGEN法により得られた標準サンプルであり、レーン10~12は、QIAGEN法を用いてDNase処理したサンプルである。QIAGEN法により得られたRNAを含むレーンでは、低分子量のスミア(smea30  
r)があり、これは、RNAが分解されていることを示している。本発明の方法により得られたRNAを含むレーンでは、低分子量のスミアはなく、リボソームRNAバンドの28S:18S特性比は2:1である。

#### 【0050】

表1: オンカラムDNase消化プロトコルと共に0.8µmのMMMカラムやQIAGEN RNeasy Mini Kitを用いた場合の、マウスの脾臓、脾臓及び胸腺(40  
ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース)からの典型的収率

#### 【表1】

260nmにおける吸光度から定量された収率(µg-tcRNA/mg-組織)

	本発明		QIAGEN 法	
	標準 (-DNase)	+DNase	標準 (-DNase)	+DNase
脾臓	12.5 µg/mg	11.5 µg/mg	13 µg/mg	12.8 µg/mg
脾臓	3.2 µg/mg	3.1 µg/mg	2.4 µg/mg	2.8 µg/mg
胸腺	4.3 µg/mg	4.4 µg/mg	3.4 µg/mg	3.2 µg/mg

#### 【0051】

表2: オンカラムDNase消化プロトコルと共に0.8µmのMMMカラムやQIAGEN RNeasy Mini Kitを用いた場合の、マウスの脾臓、脾臓及び胸腺(40  
ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース)からの典型的収率

50

G E N R N e a s y M i n i K i t を用いた場合の、マウスの脾臓、脾臓及び胸腺 (ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース) からの典型的純度

【表 2】

直接定量 PCR アッセイによって得られた、gDNA 汚染の観点からの純度  
(pg - gDNA/ ng - サンプル)

	本発明		QIAGEN 法	
	標準 (-DNase)	+DNase	標準 (-DNase)	+DNase
脾臓	$1.4 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$	$5.2 \times 10^3$	$6.4 \times 10^3$
脾臓	$2.7 \times 10^1$	$3.1 \times 10^1$	$2.9 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$
胸腺	$8.3 \times 10^1$	$1.8 \times 10^1$	$9.2 \times 10^1$	$2.7 \times 10^0$

10

【0052】

表 3 : 0.8 μm の MMM カラムや Q I A G E N R N e a s y M i n i K i t を用いた場合の、種々の冷凍マウス組織 (ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース) からの典型的収率

【表 3】

直接定量 PCR アッセイによって得られた、gDNA 汚染の観点からの純度  
(pg - gDNA/ ng - サンプル)

	低負荷		高負荷	
	本発明	QIAGEN 法	本発明	QIAGEN 法
脳 (2.5, 30mg)	$1.2 \times 10^0$	$1.1 \times 10^2$	$1.6 \times 10^0$	$7.2 \times 10^0$
肝臓 (2.5, 30mg)	$2.8 \times 10^2$	$1.3 \times 10^1$	$1.3 \times 10^1$	$3.7 \times 10^1$
腎臓 (2.5, 30mg)	$2.1 \times 10^1$	$5.5 \times 10^1$	$8.9 \times 10^1$	$1.5 \times 10^0$
脾臓 (2.5, 15mg)	$2.1 \times 10^1$	$1.9 \times 10^2$	$2.0 \times 10^1$	$4.2 \times 10^1$
HeLa 細胞 ( $5 \times 10^5$ , $4 \times 10^6$ )	$6.8 \times 10^2$	$6.8 \times 10^1$	$1.9 \times 10^0$	$1.2 \times 10^1$

20

【0053】

表 4 : 8 層ガラスファイバー予備濾過カラムを用いて予備濾過後、0.8 μm の MMM カラムや Q I A G E N R N e a s y M i n i K i t を用いて単離した場合の、冷凍マウス組織 (ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース) からの典型的収率

【表 4】

260 nm における吸光度から定量された収率 (μg - tcRNA/ mg - 組織)

	低負荷		高負荷	
	本発明	QIAGEN 法	本発明	QIAGEN 法
脳 (2.5, 30mg)	0.6 μg/mg	0.6 μg/mg	0.8 μg/mg	0.8 μg/mg
肝臓 (2.5, 30mg)	4.6 μg/mg	5 μg/mg	4.5 μg/mg	4.6 μg/mg
腎臓 (2.5, 30mg)	2.3 μg/mg	2.9 μg/mg	2.7 μg/mg	2.7 μg/mg
脾臓 (2.5, 15mg)	3.1 μg/mg	2.5 μg/mg	3.7 μg/mg	2.1 μg/mg
HeLa 細胞 ( $5 \times 10^5$ , $4 \times 10^6$ )	13.8 μg/mg	22.8 μg/mg	15.5 μg/mg	16 μg/mg

40

【0054】

gDNA 汚染の低減は多くの分子生物学アッセイにとって重要であり、特に定量的 RT - PCR では重要である。RT - PCR は、一般に 2 ステップからなる反応又はアッセイであり、第 1 のステップは、逆転写酵素反応により cDNA テンプレートを生成することである。第 2 のステップは、Taq ポリメラーゼのような DNA ポリメラーゼによって P

50

CRを生成することである。グノミックDNA汚染物質は、定量的RT-PCR用途においてバックグラウンドの増加を引き起こす。これは、ネガティブコントロール(cDNAテンプレートなし)のサンプルからもシグナルが発せられることによって確認される。テンプレートサンプルの生成において逆転写酵素を省略すると(即ち-RT反応)、cDNAテンプレートが生成されず、このサンプルからのシグナルは、gDNA汚染物質由来のものである。「+RT」サンプルからのシグナルは、cDNA又は汚染物質であるgDNAのいずれかに起因して生成したものである。したがって、汚染物質であるgDNAが生成したシグナルを定量化するためには、「-RT」サンプルが重要である。

#### 【0055】

図5～図7は、ABI7000と関連ソフトウェアを用いて、種々の脾臓RNAから得られた定量的PCRの生産量を示している。本発明のカラム及び方法により単離されたRNAと、QIAGEN RNeasy Mini Kitを用いて単離されたRNAの結果を図5に示す。本発明のカラム及び方法を用いて単離したRNAからの反応のバックグラウンドは、QIAGEN法で単離したRNAからの反応のバックグラウンドより大幅に低かった。QIAGENサンプルのバックグラウンドは、製造業者の指示に従ってオンカラムDNase消化を用いることで、本法のサンプルのレベルにまで低減させることができる。この結果を図6に示している。本法のRNAからのバックグラウンドは、オンカラムDNase消化によってさらに低減させることができる(図7参照)。

#### 【0056】

RNA単離のメカニズムは、沈殿を介する。精製されたRNA、ある程度精製された(予備濾過後)状態のRNA、又は複雑な生体サンプル内のRNAは、グアニジンとエタノールの存在下で沈殿する。その沈殿物を、例えば遠心分離することで収集することができる。本発明のRNA単離膜カラムを用いることで、RNA沈殿物の収集、収集された沈殿物の洗浄(洗浄容積と遠心分離時間が低減される)、ターゲット核酸の再懸濁及び溶出が容易になる。

#### 【0057】

膜材料は沈殿物に対する物理的障壁として機能する受動的な役割しか果たさないが、沈殿物を効率的に収集し、吸収による損失を低減させるために、ポリマー材料の性質が重要となる。例えば、種々の細孔径を有する膜を比較すると、RNA回収量の変化に帰着する。同様に、種々のポリマー成分で製造された膜を比較した場合にも、RNA回収量は変化する。

#### 【0058】

膜の細孔径と回収RNA重量の変化との関係を示すために、マウスの脾臓をホモジナイズして、ガラスファイバー予備濾過カラムに通過させた。この予備濾過されたホモジネートのアリコート250 $\mu$ L(12.5mg)を、70%エタノール250 $\mu$ Lと混合し、以下に示す種類の異なる4つのスピニングカラムに導入した。(i)0.8 $\mu$ mMM(ポリスルホンとPVP(ポリ(ビニルピロリドン))の混合物)、(ii)0.8 $\mu$ mBTS(ヒドロキシプロピルセルロース処理したポリスルホン)、(iii)0.1 $\mu$ mMM、(iv)0.1 $\mu$ mBTS。これらのスピニングカラムを洗浄し乾燥させた後、50 $\mu$ Lを用いて各カラムからターゲットRNAを溶出させた。溶出液内のRNAの回収量を、Agilent model 8453 UV/Vis分光光度計を用いて、260nmにおける吸光度を測定することで定量した。図8は、O.D.260の測定値から導出したターゲットRNA収率を示すグラフである。図8の最初の2つのカラム(以下の表10にもデータを示している)を比較すると、回収RNAの質量に関して、MM膜はBTS膜に比べて際立った利点を有することを示している。これらの膜は、各々異なるポリマー材料で構成されている。カラム2、3、4(0.8BTS、0.2BTS及び0.1BTS)の結果から、最適な性能を実現するためには、膜の細孔径も最適化しなければならないことが分かる。

#### 【0059】

キットもまた、本発明の1つの実施形態である。本発明のキットには、少なくとも1つ

10

20

30

40

50

の予備濾過カラムが含まれる。一態様では、予備濾過カラムは、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーなどのファイバー材から構成される。キットにはまた、少なくとも1つのRNA単離カラムも含まれる。このRNA単離カラム内の膜として、限定はしないが、BTS、PVDF、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスルホン、MMM、PVP、及びこれらの混合物が挙げられる。試薬もまた、本実施形態のキットの一部である。当該試薬には、少なくとも1つの有機溶媒と少なくとも1つの溶解バッファーが含まれる(上述したものなど)。他の試薬もまた、キット内に含めることができる。本発明を実施するための実験者に対する説明書も含まれる。

#### 【実施例1】

#### 【0060】

#### 構成要素の作製

##### (a) シリコンカーバイドウィスカーカラムの作製

サーメット社(米国ニューヨーク州バッファロー)のシリコンカーバイドウィスカーを、水溶液中でスラリー化させた。スピнкаラム装置(オロケム社、米国イリノイ州ウェストモント)を真空マニホールド上に乗せ、細孔径が約7 $\mu$ mのポリエチレンフリット(ボレックス社、米国ジョージア州フェアバーン)をスピнкаラム内に配置した。次いで、SiCwスラリーをスピнкаラム内の前記フリット上に配置し、真空にした。カラムを真空でわずかに乾燥させた。プラスチック固定リングをシリコンカーバイドウィスカー層上に配置し、スピнкаラムを固定した。

#### 【0061】

##### (b) ファイバーフィルタカラムの作製

この特定の例では、ファイバーフィルタ材としてWhatman GF/F Glass Fiber Filter(cat番号1825-915)をフィッシャーサイエントフィック社(米国ジョージア州アトランタ)から購入した。(購入した大きなシート又はディスク状の)多数の層を、9132"ハンドパンチ(マクマスターカー社、米国イリノイ州シカゴ)を用いてパンチし、本発明の予備フィルタを形成し、それを、90 $\mu$ mのポリエチレンフリット(ボレックス社、米国ジョージア州フェアバーン)を備えるスピнкаラム(オロケム社、米国イリノイ州ウェストモント)内に配置した(その場合、ファイバーフィルタ材は、ポリエチレンフリット上に配置した)。フィルタ材上にしっかりと固定した固定リングを用いてファイバー材をカラムに固定し、ファイバー(オロケム社、イリノイ州ウェストモント)が過剰に膨らむのを防いだ。例として図2を参照されたい。

#### 【0062】

##### (c) 試薬の調製

以下の溶液を調製し、又は市販されているもの入手し、後述する実施例に記載される方法において使用した。調製した試薬は全て、スクエアゼリーのH<sub>2</sub>O内で調製し、溶解溶液、DNase I及びプロテイナーゼK以外は、室温で保存した。βメルカプトエタノールを含む溶解溶液は4℃で保存し、DNase I及びプロテイナーゼKは-20℃で保存した。

#### 【0063】

#### 溶解バッファー/溶液ストック

4M グアニジンチオシアネート(シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

25mM トリス、pH7(アンピオン社、米国テキサス州オースティン)

実際の溶液の調製では、βメルカプトエタノールを加えて143mMの濃度にした。

#### 【0064】

#### 洗浄バッファー#1

約0.2M~約2M、例えば1M、のグアニジンチオシアネート(シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

pHが約6~約9、例えば7、の25mM トリス(アンピオン社、米国テキサス州オースティン)

10

20

30

40

50



約 5 % ~ 約 25 %、例えば 10 %、のエタノール (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

【0065】

#### 洗浄バッファー # 2

pH が約 6 ~ 約 9、例えば 7、の 25 mM トリス (アンピオン社、米国テキサス州オースティン)

約 40 % ~ 90 %、例えば 70 %、のエタノール (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

【0066】

#### QIAGEN (登録商標) 試薬

製造業者の指示に従って、RLT、RW1、RPE の各バッファーを調製した (RNeasy Mini Kit、部品番号 74104、米国カリフォルニア州バレンシア)。

【0067】

#### DNase I

RNase フリー DNase I は、フェルメンタス社 (米国メリーランド州ハノーバー) から入手した。

プロテインアーゼ K は、フェルメンタス社 (米国メリーランド州ハノーバー) から入手した。

【0068】

#### DNase バッファー 10X

1 M トリス、pH 8 (アンピオン社、米国テキサス州オースティン)

100 mM 硫酸マグネシウム (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

100 mM 塩化カルシウム (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

1 mg / mL ウシ血清アルブミン (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

【0069】

#### 溶出バッファー

溶出バッファーの 3 つの例は、pH 6 ~ 9 の、10 mM の EDTA 及び 10 mM のクエン酸ナトリウム、並びにヌクレアーゼフリー水である。

【実施例 2】

【0070】

#### マウス組織からの RNA の単離

次に、マウスの種々の組織及び細胞から RNA を単離する実験に関して説明する。RNA は、SiCw カラム (図 1) を用いて単離した。RNA は、製造業者の指示に従って、Bioanalyzer 2100 (アジレントテクノロジーズ社、カリフォルニア州パロアルト、部品番号 G2938B) において、RNA 6000 Nano Assay (アジレントテクノロジーズ社、部品番号 5065-4476) を用いて、分析した。図 9 及び表 5 に、多数のアッセイから得られた結果を示している。即ち、図 9 に示している全てのアッセイが同一のチップ上で実施されたわけではない。図 9 記載の記号を説明すると、L はアンピオン社 RNA 6000 Ladder (部品番号 7152) の Ladder であり、レーン 1 ~ 2 は SiCw カラムにより単離した脳の RNA、レーン 3 ~ 4 は SiCw カラムにより単離した肝臓の RNA、レーン 5 ~ 6 は SiCw カラムにより単離した腎臓の RNA、レーン 7 ~ 8 は SiCw カラムにより単離した脾臓の RNA、レーン 9 ~ 10 は SiCw により単離した脾臓の RNA である。表 5 には、RNA 収率をまとめている。

【0071】

採取直後に液体窒素で急速冷凍したマウスの臓器は、ベルフリーズバイオロジカル社 (米国アーカンソー州ジョージ) から入手した。あるいはまた、マウスの臓器は、採取後すぐに用いることもできる、RNA Later (アンピオン社、米国テキサス州オースティン) 溶液中で保存することもできる。

【0072】

10

20

30

40

50

サンプルの重さを量り、約4～約8のpHを有する過剰な溶解溶液（出願者の方法、典型的には20倍過剰）中で、OMNI TH組織ホモジナイザ（オムニ社、米国バージニア州フレントン）を用いて15000rpmにて30秒間パワーホモジナイズを実施した。

#### 【0073】

細胞株は、American Type Tissue Collection (ATCC 米国バージニア州20108マナサス)から入手し、提供された指示に従って成長させた（表5を参照）。細胞をトリプシン処理（trypsinize）し、培養容器から分離し、再び懸濁させ、血球計算器を用いてカウントした。懸濁液を1000×gにて10分間遠心分離した。得られたペレットを溶解溶液内に再び懸濁させ、最終的な濃度を8.3×10<sup>6</sup>細胞/mLにして、1分にわたって強力に渦動混合した。あるいはまた、細胞を細胞培養容器内に溶解させることもできる。

10

#### 【0074】

組織又は細胞のホモジネート（典型的には300μL～600μL）を、スピнкаラム内のガラスファイバー予備フィルタに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機（ブリュンマンス社、米国ニューヨーク州ウエストベリー）内で16000×gにて3分間遠心分離した。

#### 【0075】

各組織ホモジネートに、等量の70%エタノールを加え混合した。シリコンカーバイドウィスカー（SiCw）15mgを含むスピнкаラムを、キャップのない2mLの収集管内に配置し、エタノール含有ホモジネートを当該スピнкаラムに加えた。スピнкаラムを16000×gにて少なくとも10秒間スピンさせた。フロースルー（カラムに吸着しなかった物質）を収集管からデカントし、スピнкаラムを収集管に戻した。

20

#### 【0076】

スピнкаラムを500μLの洗浄バッファー#1で洗浄し、16000×gにて少なくとも10秒間遠心分離した。遠心分離後、スピнкаラムに対してDNase消化を実施することができる。DNase消化を実施しない場合は、さらに洗浄バッファー#2を、それぞれの回で500μL及び250μL加えて、16000×gにて少なくとも10秒間2回遠心分離する。次いで、スピнкаラムを16000×gにて2分間遠心分離し、最後の少量の洗浄バッファー#2を除去した。スピнкаラムを2mLの収集管から取り出して、1.5mLのヌクレアーゼフリーマイクロ遠心分離管内に配置した。

30

#### 【0077】

ヌクレアーゼフリー水50μLでRNAを2回溶出させ、それぞれ、15秒間及び2分間遠心分離した。次いで、RNAを-20℃又は-70℃で保存することができる。

#### 【0078】

260nm及び280nmにおける吸光度を、アジレントテクノロジーズ社の8453 UV/VIS分光光度計を用いて測定し、溶出したRNAの存在を確認した。

#### 【0079】

本実験で得たRNAを、RNA 6000 Nano Assay（アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州バークレイ）を用いて、製造業者の指示に従って、アッセイを実施した。ソフトウェアにより生成された画像を図9に示している。

40

#### 【0080】

表5及び図9から見てとれるように、本発明による方法及び装置を用いて精製したRNAは、高い収率、純度、完全性を有する。

#### 【0081】

表5：SiCwカラムを用いた場合のRNA収率（実施例2及び3参照）

【表 5】

培養細胞及びマウス組織からの t c RNA の単離

	$\mu\text{g-tcRNA}/10^6$ 個細胞 又は mg-組織	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$
HEK 293	24	2.0
HeLa S3	7.3	1.9
NIH 3T3	14.8	2.3
脳	0.6	1.8
肝臓	3.0	2.0
腎臓	2.2	2.1
脾臓	12.3	2.0
脾臓	4.7	2.1

10

## 【実施例 3】

## 【0082】

以下の実験では、種々の種類のガラスファイバーフィルタ材を用いて、RNA 単離を実施した。以下、それを並べて示す。

## 【0083】

予備濾過装置及びそれに関連する方法に関しては、種々の種類の 16 層からなるガラスファイバーフィルタを構成した。Whatman Types GF/F (カタログ番号 1825-915) 及び GF/D (部品番号 1823-150) は、フィッシャーサイエンス (米国ジョージア州アトランタ) から入手した。Pall Life Sciences Types A/B (部品番号 66211) 及び Types A/D (部品番号 66227) は、VWR 社 (米国ペンシルベニア州ピッツバーグ) から入手した。DNase 消化を実施するサンプルに関しては、後に概説するオンカラム DNase 消化法を用いた。

20

## 【0084】

以下のサンプルの精製は、製造業者の指示に従って QIAGEN (登録商標) シリカベースの方法によって、又は、本発明のシリコンカーバイドウィスカー法と装置を用いて実施した。さらに、オンカラム DNase 消化法を用いた。得られた RNA は、アジレントテクノロジーズ社の Bioanalyzer 2100 (アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州パロアルト、部品番号 G2938B) を用いて、同社の RNA 6000 Nano Assay (部品番号 5065-4476) により、製造業者の指示に従って、アッセイした。図 3 は、ソフトウェアにより生成された電気泳動アッセイの結果を示している。

30

## 【0085】

採取後すぐに液体窒素で急速凍結したマウスの脾臓を、ベルフリーズバイオロジカル社 (米国アーカンソー州ロジャーズ) から入手した。脾臓には大量の gDNA が存在するため、脾臓組織は、RNA を単離するのにもっとも困難な組織の一つである。そのため、本明細書で示す実施例では、脾臓組織を採用した。予備濾過後、シリコンカーバイドウィスカー (SiCw) 及び / 又はシリカベース (QIAGEN) 単離法を用いて、脾臓 RNA を単離した。

40

## 【0086】

サンプルの重さを量り、約 4 ~ 約 8 の pH を有する過剰の溶解バッファー (上記のもの) 又はキアゲン社の RLT (典型的には 20 倍過剰) 中で、OMNI TH 組織ホモジナイザ (オムニ社、米国バージニア州ワレントン) を用いて、30 秒間 15000 rpm にてパワーホモジナイズした。

## 【0087】

組織ホモジェネート (典型的には約 300  $\mu\text{L}$  ~ 600  $\mu\text{L}$ ) は、16000  $\times$  g にて 3 分間遠心分離することにより前処理して、QIAGEN カラムに使用した。又は、本発明のガラスファイバー予備フィルタに加え、次いで Eppendorf 5415D マイクロ遠心分離機 (プリングマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー) を用いて 160

50

0.0 × g にて 3 分間遠心分離することにより前処理して、SiCw カラムに使用した。

【0088】

各組織ホモジネートに、等量の 70 % エタノールを加え混合した。次いで、エタノール含有ホモジネートを、キアゲン社の RNeasy Mini Kit (米国カリフォルニア州バレンシア、部品番号 74104) からのミニスピンカラムか、又は本明細書で説明した SiCw に加えた。

【0089】

次いで、スピンカラムを 16000 × g にて少なくとも 10 秒間遠心分離した。各々から得られた流出物を収集し、2 mL の収集管からデカントし、スピンカラムを収集管の中に戻した。

【0090】

次いで、スピンカラムを 700 μL の RW1 (キアゲン社 RNeasy カラム) 又は 700 μL の洗浄バッファー #1 で洗浄し、16000 × g にて少なくとも 10 秒間遠心分離した。SiCw スピンカラムを使用したサンプルに関しては、SiCw スピンカラム内容物に対して、以下に説明するように、DNase 消化を実施するか、又は洗浄バッファー #2 による洗浄を実施した。

【0091】

DNase 消化を実施しないカラムに関しては、上記のように、500 μL (一回目) 及び 250 μL (二回目) の RPE (キアゲン社 RNeasy カラムバッファー) 又は洗浄バッファー #2 を加えて、カラムを、上記のように 2 回遠心分離した (少なくとも 10 秒間、16000 × g)。2 回目の遠心分離を 16000 × g にて 2 分間へと延長し、最終的に微量の RPE 又は洗浄バッファー #2 を除去した。各カラムを、2 mL の収集管から取り出し、1.5 mL のヌクレアーゼフリーマイクロ遠心分離管内に配置した。500 μL のヌクレアーゼフリー H<sub>2</sub>O を用いて、RNA を 2 回溶出させた。次いで、RNA を -70 °C で保存した。

【0092】

上記のように、例えば、洗浄バッファー #2 を加える前に、サンプルを任意に DNase 処理することができる。DNase 処理を実施するカラムに関しては、DNase I を、最終的には 100 μL の容積になるように、1 × DNase バッファー中で 0.5 μg / μL の濃度に加えて、SiCw のカラムに加えた。(本明細書に記載する本発明の方法においては、DNase バッファーとして、例えば 100 mM 程度の低濃度の塩を使用しているが、殆どの従来の方法では高濃度の塩を必要とすることに注意されたい。例えば、オンカラム消化用の一部の市販の DNase バッファーには、1 M の塩化ナトリウムが使用されている)。DNase は、高濃度のイオンに非常に敏感であるため、本発明の方法では、イオン強度を強めたり、結合を保持したりする塩を使用しない (上記実施例 1 において列挙されている試薬を参照されたい)。例えば、本実施例では、10 mM の塩化カルシウムしか使用しない。次いで、25 °C にて 15 分間カラムを培養した。洗浄バッファー #1 を 500 μL 加え、16000 × g にて少なくとも 10 秒間遠心分離して消化を終了させた。次いで、洗浄バッファー #2 で洗浄し、最終的に微量の洗浄バッファー #2 を除去した後に、上記のように溶出を実施した。QIAGEN 法を利用するサンプルに関しては、DNase 消化は実施しなかった。

【0093】

Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ社、米国カリフォルニア州フォスターシティ) を用いて、5' ヌクレアーゼアッセイ又は「リアルタイム」PCR アッセイ実施して、ゲノミック DNA の汚染物質を定量化した。この種のアッセイでは、各 PCR サイクルで蓄積される PCR 生成物の量がモニタリングされる。これは、PCR 生成物を検出するための、非常に高感度で再現性の高いアッセイである。

【0094】

マウス脾臓から単離した tcrRNA ( ~ 20 ng ) を、マウスに特異的なプライマとブ

10

20

30

40

50

ローブを含有する反応混合物 ( Genbank Accession NM\_008084 ) グリセラルデヒド-3-フォスフェート デヒドロゲナーゼ ( glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH ) に加えた。全てのサンプルを、500nMの両プライマ、200nMの蛍光プローブ、及び1X Taqman Universal Master Mix ( 部品番号43044437 ) から構成される反応混合物内で、当分野で周知の条件下で実施した。マウスのゲノミックDNA ( プロメガ社、米国ワイオミング州マディソン ) を倍々希釈して、標準曲線を作った。全てのサンプル、標準サンプル、非鋳型対照サンプルに関して、2回実施した。

#### 【0095】

マウスのGAPDHアッセイにより、エクソン内で78塩基対のフラグメントが増幅された。GAPDHアッセイのプライマとプローブは、プライマ発現ソフトウェアパッケージ ( アプライドバイオシステム社、米国カリフォルニア州フォスターシティ、部品番号4329442 ) において使用されるように設計されている。プライマは脱塩され、また、プローブ ( 5' が6-FAMにより、3' がBHQ-1により標識化されている ) は、陰イオン交換、それに次ぐ逆位相HPLC ( バイオサーチテクノロジー社、米国カリフォルニア州ナバト ) により、精製された。

#### 【0096】

両アッセイに関するアッセイサイクリングパラメータ ( assay cycling parameter ) は、製造業者によって設定されたデフォルト条件 ( 即ち、50℃にて2分間、95℃にて10分間、次いで95℃にて15秒間と60℃にて1分間を40サイクル ) であった。単離されたtcrAN中のgDNAの定量は、マウスのgDNA標準曲線から計算し実施した。

#### 【0097】

表6は、遠心分離、予備濾過、DNase消化、QIAGEN法、本発明のSiCw法などを種々に組み合わせて、予備濾過及び/又はオンカラムDNase消化を施した際の、gDNAの低減を示す、定量的PCRアッセイの結果である。表2は、図3に示す脾臓tcrNA実験に関するRNA収率及びgDNA汚染を示すものである。gDNA汚染が高いサンプルについては収率を示していない。gDNAの量は、上記実施例で説明したリアルタイムPCRアッセイにより決定した。

#### 【0098】

図10は、Agilent RNA6000 Nano Assayで検出されたgDNA汚染物質濃度を示している。gDNA濃度は、レーン1~3、10~12、16~18、19~21では高レベルであるが、例えばレーン4~6では低レベルである。図4の凡例は、以下の通りである。Lは、Ambion RNA6000 Ladder ( 部品番号7152 ) のラダー、レーン1~3は、精製した ( 遠心分離した ) ホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン4~6は、GF/Fで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン7~9は、GF/Fで予備濾過したホモジネートをオンカラムDNase消化処理しSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン10~12は、GF/Dで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン13~15は、A/Bで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン16~18は、A/Dで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン19~21は、精製した ( 遠心分離 ) ホモジネートをRNeasy minicolumnで単離した脾臓RNA、レーン22~24は、GF/Fで予備濾過しRNeasy columnで単離した脾臓RNAである。

#### 【0099】

このアッセイによって、特定の種類のファイバーとフィルタだけが、総gDNA汚染物を効果的に除去できることが実証された。例えば、レーン4、5及び6からわかるように、Whatman GF/Fフィルタ材を使用することが効果的であった。この場合、最終的な溶出サンプルには、gDNA汚染物質はほとんど含まれておらず、DNase消化

10

20

30

40

50

は実施しなかった。同様に、本発明のガラスファイバーフィルタを使用した予備濾過法によって Q I A G E N 法を補足したレーン 22 ~ 24 では、Q I A G E N 法を使用した他の全サンプル / レーンと比較して、存在する g D N A 汚染物がはるかに少なかった。

#### 【0100】

対照的に、レーン 10 ~ 12 及び 16 ~ 18 では、かなり多くの g D N A が存在した。レーン 10 ~ 12 では、約 3  $\mu$  m の粒子を保持する能力を有するフィルタ材を使用し、また、レーン 16 ~ 18 では、約 1  $\mu$  m の粒子を保持する能力を有するフィルタ材を使用した。一方、レーン 4 ~ 6 及び 22 ~ 24 で使用したフィルタ材は約 0.7  $\mu$  m の粒子を保持する能力を有するものであった。従って、フィルタの種類、組成、性能を最適化する必要がある。

#### 【0101】

表 6 及び図 10 を参照すると、D N a s e 消化を実施しないレーン 1 ~ 3、10 ~ 12、16 ~ 18、19 ~ 21 では、R N A 定量化が本質的に無意味になるほど多くの g D N A 汚染物質の存在することが観察された。しかしながら、レーン 4 ~ 6 及び 22 ~ 24 の結果から、本発明の予備濾過法及び装置は、本質的に無視できる量の g D N A 汚染に帰着することが確認された。実際、予備濾過では、D N a s e 処理を実施しなくても、D N a s e 処理後に残存する g D N A とほとんど同程度の g D N A しか残さず、D N a s e 処理とほぼ同じ R N A 収率が得られる。本発明の予備濾過法と装置を使用したレーン 4 ~ 6 の R N A 収率及び g D N A 量と、従来の D N a s e 処理と予備濾過法を組み合わせることで、全ての g D N A を実質的に除去することができ、実験者は、特定の用途において望まれる場合には、D N a s e 処理を回避することができ、

#### 【0102】

Q I A G E N 法に関しては、これらの方法で使用する D N a s e 消化はプロメガ社によって説明されており、そのプロトコルは Q I A G E N キットに採用されている。しかしながら、D N a s e 消化の使用は、常に、最終用途に依存する。例えば、Q I A G E N キットを使用しても、ノーザンハイブリダイゼーションでは D N a s e 消化はおそらく必要であろう。従って、D N a s e 消化を使用するかしないか、また必要であるか否かは、R N A を単離する最終用途に依存する。

#### 【0103】

本発明の方法及び装置によって、R N A を単離する元のサンプルから効果的に g D N A を除去し、D N a s e 消化を不必要にし（しかし必要な場合は D N a s e 消化と両立できる）、特にシリカベースのキットである市販の R N A 単離キット（例えばキアゲン社の R N e a s y k i t）と共に機能し、それらの効果を高めることが確認された。

#### 【0104】

表 6 : 図 9 に示す単離 t c R N A に関する、R N A 収率及び g D N A 汚染量

【表 6】

予備濾過された脾臓RNA単離体に関するgDNAの低減

	図10中のレーン	$\mu\text{g} - \text{tcRNA} / \text{mg} - \text{組織}$	$\text{pg} - \text{gDNA} / \text{ng} - \text{tcRNA}$
遠心分離後 SiCw 単離	1-3	NA	344
GF/F 予備濾過後 SiCw 単離	4-6	4.7	3.48
GF/F 予備濾過及び DNase 処理後 SiCw 単離	7-9	4.9	0.12
GF/D 予備濾過後 SiCw 単離	10-12	NA	218.2
A/B 予備濾過後 SiCw 単離	13-15	3.3	87.83
A/D 予備濾過後 SiCw 単離	16-18	NA	302
遠心分離後 QIAGEN 法単離	19-21	NA	190
GF/F 予備濾過後 QIAGEN 法単離	22-24	4.5	1.42

10

## 【実施例 4】

【0105】

20

## マウス肝臓ホモジェネート

マウス肝臓ホモジェネートを上記のように調合し、RNA単離に用いた。実施例2で示した、濾過したホモジェネートに70%エタノールを加える手順の代わりに、等量のRNAseフリー水、70%イソプロパノール又はメタノールを加えた。この混合液をSiCwスピンカラムに加え、次いで、上記のようなRNA単離を実施した。

【0106】

260nm及び280nmにおける吸光度を、Agilent Technologies 8453 UV/VIS分光光度計で測定し、溶出したRNAの存在を確認した。

【0107】

この結果を表3に示している。

30

【0108】

表7: RNA収率

【表 7】

有機溶媒の添加による肝臓RNA収率の向上

	$\mu\text{g} / \text{mg} - \text{組織}$	$A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$
ホモジェネート	0.2	2.0
ホモジェネート + 水	0.4	2.0
ホモジェネート + エタノール	3.1	2.0
ホモジェネート + イソプロパノール	3.6	2.0
ホモジェネート + メタノール	3.2	2.0

40

## 【実施例 5】

【0109】

## 植物組織からのRNA単離

シロイヌナズナの葉の重さを量り、OMNITH組織ホモジナイザ(オムニ社、米国バージニア州ワレントン)を用いて、過剰の溶解バッファー内で15000rpmにて30秒間パワーホモジナイズした。採取後に葉の組織を冷凍し、上記のようにホモジナイズすることもできる。

【0110】

組織ホモジェネート(典型的には約300 $\mu\text{L}$ ~600 $\mu\text{L}$ )を、16000 $\times g$ にて

50

2分間遠心分離することにより前処理した。又は、本発明のガラスファイバー予備フィルタに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機（プリंकマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー）を用いて、16000×gにて2分間遠心分離することにより前処理した。

【0111】

各組織ホモジェネートに、等量の70%エタノール（結合促進剤の一例）を加え混合した。次いで、スピncラムを16000×gにて少なくとも10秒間遠心分離した。各サンプルからの流出物を収集し、それぞれ2mLの収集管からデカントし、スピncラムを収集管に戻した。

【0112】

次いで、500μLの洗浄バッファー#1を用いてスピncラムを洗浄し、16000×gにて少なくとも10秒間遠心分離した。次いで、上記のように各ラムに、1回目は500μL、2回目は250μLの洗浄バッファー#2を加えて、16000×gにて少なくとも10秒間2回遠心分離した。2回目の遠心分離を16000×gにて2分間に延長して、最終的に微量の洗浄バッファー#2を除去した。次いで、各ラムを2mLの収集管から取り出し、1.5mLのマイクロ遠心分離管内に配置した。次いで、500μLのスクレーパーH<sub>2</sub>Oを用いて、RNAを2回溶出させた。次いで、RNAを-20℃又は-70℃で保存した。

【0113】

植物組織のRNA単離の結果を図11に示す。得られたRNAについて、Bioanalyzer 2100（アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州パロアルト、部品番号G2938B）において同社のRNA 6000 Nano Assay（部品番号5065-4476）を用いて、製造業者の指示に従ってアッセイを実施した。図5は、コンピュータで生成した、電気泳動アッセイ結果のプリントアウトである。図5の凡例は、以下の通りである。Lは、Ambion RNA6000 Ladder（部品番号7152）のラダー、レーン1～3は、GF/Fで予備濾過したホモジェネートをSiCwラムで単離したシロイヌナズナのRNA、レーン4～6は、精製した（遠心分離した）ホモジェネートをSiCwラムで単離したシロイヌナズナのRNAである。

【0114】

図9及び表7に示す動物組織と同様に、レーン1～3に示す結果から、本発明の予備濾過方法及装置を使用することで、植物組織サンプルからもほとんどのgDNAを除去し得ることが理解されよう。実際、予備濾過後に存在するgDNA濃度は、高感度アッセイを使用しても検出できなかった。

【0115】

ゲノミックDNA汚染物質は、Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System（アプライドバイオシステムズ社、米国カリフォルニア州フォスターシティ）において、5'スクレーパーアッセイ、又は「リアルタイム」PCRアッセイにより定量化した。この種のアッセイでは、PCRサイクル毎に蓄積するPCR生成物の量がモニタリングされる。これはPCR生成物を検出するための、非常に高感度で再現性の高いアッセイである。

【0116】

シロイヌナズナの葉から単離したtcRNA（200ng）を、18SリボソームRNAに対して特異的なプライマ及びプローブを含む反応混合物に添加した。製造業者の基準によれば、全サンプルを、500nMの両プライマ、200nMの蛍光プローブ、1×Taqman Universal Master Mix（部品番号43044437）から構成される反応混合液内で実施した。シロイヌナズナの葉から精製したDNAをプロメガ社のキットを用いて倍々希釈して標準曲線を作った。全サンプル、標準サンプル、非特異対照サンプルについて2回実施した。

【0117】

このアッセイによって、エクソン内で187塩基対のフラグメントが増幅される。プラ

10

20

30

40

50



イマ及びブローブは、プライマ発現ソフトウェアパッケージ（アブライドバイオシステムズ社、米国カリフォルニア州フォスターシティ、部品番号4329442）を使用して設計した。プライマは脱塩され、また、ブローブ（5'が6-FAMにより、3'がBHQ-1により標識化されている）は、陰イオン交換、及びそれに次ぐ逆位相HPLC（バイオサチテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州ナバト）により精製した。両アッセイのアッセイサイクリングパラメータは、製造業者が設定したデフォルト条件であった。即ち、50℃にて2分間、95℃にて10分間、次いで95℃にて15秒間から60℃にて1分間を40サイクル実施した。

【0118】

単離したtcRNA中のgDNAの定量は、シロイヌナズナgDNA標準曲線から計算して実施した。この結果を表8に示す。図11及び表8に示す結果によって、本発明のガラスファイバー予備濾過法と装置が、植物組織においても使用できる汎用性を有することを示している。

【0119】

表8：図11に示す単離RNAに関する、RNA収率及びgDNA汚染量

【表8】

予備濾過したシロイヌナズナRNA単離体に関するgDNAの低減

	図11中のレーン	$\mu\text{g-tcRNA/mg-組織}$	$\text{pg-gDNA/ng-tcRNA}$
予備濾過後	1-3	0.18	ND*
SiCw単離			
精製（遠心分離）後	4-6	0.13	52.4
SiCw単離			

ND\*：検出されず

【実施例6】

【0120】

他の組織の単離

上記の単離精製法に加え、皮膚、心臓及び筋肉のような、結合組織及び構造タンパク質の多い組織からのRNAの単離もまた、プロテイナーゼK処理により容易になる。この場合、まず始めに、そのような組織を上記のようにホモジナイズし、等量の水をサンプルに加える。次いで、プロテイナーゼKを加えて、最終的な濃度を1ユニット/100 $\mu\text{L}$ にし、混合し、55℃にて10分間培養することができる。次いで、本発明の予備フィルタカラムを用いてホモジェネートを遠心分離することができ（さらなる処理を実施してもなくてもよい）。この場合、上記のDNase処理を実施してもよいし実施しなくてもよい。

【0121】

また、固相抽出（SPE）カラム及び真空ポンプと共に使用するよう設計されている真空マニホールドを用いて、多くのサンプルからのRNA調製を容易にすることができ。サンプルは上記のようにホモジナイズし、精製し、エタノールなどの低分子量アルコールと混合する。本発明のSiCwカラムを使用する場合には、SiCwスピニングカラムを真空マニホールドに乗せ、コックを閉じた位置にする。次いで、エタノールを含むホモジェネートをカラムに加え、コックを開いてホモジェネートを流すことができる。次いで、コックを閉じて、洗浄バッファー#1を500 $\mu\text{L}$ に加え、再びコックを開く。先述のように、500 $\mu\text{L}$ 及び250 $\mu\text{L}$ の洗浄バッファー#2を用いて、このプロセスを繰り返す。次いで、コックを2分間開いたままにしてスピニングカラムを乾燥させ、次にスピニングカラムを1.5mLマイクロ遠心分離管内に配置して、先述の最終溶出を実施する。

【実施例7】

【0122】

RNA単離カラムにおいて使用する構成要素の準備

単離カラムの製造

単一層からなる膜（例えば0.8 $\mu\text{m}$ BTS）を、ミニスピニングカラム装置（オロケム社

10

20

30

40

50

、米国イリノイ州ウェストモント)内の約90 $\mu$ mの細孔径を有するポリエチレンフリット(ボレックス社、米国ジョージア州フェアバーン)上に配置した。プラスチックの固定リングを当該アセンブリに乗せ、固定した(図3)。

【0123】

#### ファイバー予備濾過カラムの製造

予備濾過カラムは、米国特許出願第10/631、189号に記載の通り製造した。参照することで、その内容の全てを本明細書に取り入れることとする。これは、実施例1に概略した手順と同じである。

【0124】

#### 試薬の調合

実施例1cと同様に試薬を調製した。

【実施例8】

【0125】

#### マウス組織からのRNAの単離

オンカラムDNase消化と共に、又はオンカラムDNase消化を行うことなく、膜単離カラムを用いて、マウスの種々の組織及び細胞からRNAを単離した。RNAは、製造業者の指示(参照することでその内容の全てを本明細書に取り入れることとする)に従って、Bioanalyzer 2100(アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州パロアルト、部品番号G2938B)において、RNA 6000 Nano Assay(同社、部品番号5065-4476)を用いてアッセイを実施した。

【0126】

採取後すぐに液体窒素で急速凍結したマウスの臓器は、ペルフリーズバイオロジカルズ社(米国アーカンサス州ロジャース)から入手した。あるいはまた、マウスの臓器は採取後すぐに使用することもできるし、RNA Later(アンピオン社、米国テキサス州オースティン)の溶液内にて保存することもできる。

【0127】

サンプルの重さを量り、OMNI TH組織ホモジナイザ(オムニ社、米国バージニア州ワレントン)を用いて、15000rpmにて30秒間、過剰な溶解溶液(典型的には20倍過剰)中でパワーホモジナイズした。

【0128】

細胞株は、American Type Tissue Collection(ATCC 米国バージニア州20108マナサス)から入手し、提供された指示に従って成長させた。細胞をトリプシン処理(trypsinize)し、培養容器から分離し、再び懸濁させ、血球計算器を用いてカウントした。懸濁液を1000 $\times$ gにて10分間遠心分離した。得られたペレットを溶解溶液内に再び懸濁させ、最終的な濃度を8.3 $\times 10^5$ 細胞/mLにして、1分にわたって強力に渦動混合した。あるいはまた、細胞を細胞培養容器内に溶解させることもできる。

【0129】

組織又は細胞のホモジネート(典型的には300 $\mu$ L~600 $\mu$ L)を、スピンカラム内のガラスファイバー予備フィルタに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機(プリンクマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー)内で16000 $\times$ gにて3分間遠心分離した。

【0130】

各組織ホモジネートに、等量の70%エタノールを加え、混合した。このエタノール含有ホモジネートを、実施例7で説明したとおりに組み立てた、細孔径が0.8 $\mu$ mの単一層からなるMMM膜(ボールライフサイエンス社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)を備える単離スピンカラムに加えた。次いで、そのスピンカラムを16000 $\times$ gにて少なくとも10秒間スピンさせた。フロースルーを収集管からデカントし、スピンカラムを収集管に戻した。

【0131】

10

20

30

40

50

次いで、500  $\mu$ L の洗浄バッファー #2 (上記のもの) を用いてスピンカラムを2回洗浄し、16000  $\times$  g に少なくとも10秒間遠心分離した。次いで、スピンカラムを、16000  $\times$  g にて2分間遠心分離し、微量の洗浄溶液を除去した。

【0132】

RNA をスクレアーゼフリー水 25  $\mu$ L を用いて溶出させ、16000  $\times$  g にて1分間遠心分離した。次いで、RNA を -70  $^{\circ}$ C で保存した。

【0133】

アジレントテクノロジー社の 8453 UV/VIS 分光光度計を用いて、260 nm 及び 280 nm における吸光度を測定し、溶出した RNA の存在を確認した。表 9 はこの結果得られた RNA 収率の一覧である。図 12 は、RNA 6000 Nano Assay ソフトウェアで生成した画像である。

【0134】

【表 9】

組織	$A_{260nm}$ により定量された 収率
脳 (30mg)	0.8 $\mu$ g/mg
肝臓 (30mg)	4.5 $\mu$ g/mg
腎臓 (30mg)	2.7 $\mu$ g/mg
脾臓 (10mg)	15 $\mu$ g/mg
膵臓 (15mg)	4.3 $\mu$ g/mg
HeLa 細胞 (5x10 <sup>6</sup> 個)	15.5 $\mu$ g/mg
NIH3T3 細胞 (5x10 <sup>6</sup> 個)	15 $\mu$ g/mg

【0135】

表 9 及び図 12 から分かるように、本発明の方法及び装置を使用して精製した RNA は、高い収率、純度、完全性を有する。図 12 では、レーン 1 は、分子量決定用のラダーであり、1 は脳、2 は腎臓、3 は肝臓、4 は脾臓、5 は膵臓、6 はヒラー細胞、7 は NIH3T3 である。

【実施例 9】

【0136】

#### 膜の最適化

種々のポリマー膜を有する単離スピンカラムを用いて、採取した後すぐに液体窒素で急速冷凍したマウスの脾臓と胸腺 (ヘルフリーズバイオロジカル社 (米国アーカンサス州ロジャース) から入手) から RNA を単離した。使用した膜は、0.1  $\mu$ m、0.2  $\mu$ m、0.8  $\mu$ m の BTS (ボールライフサイエンス社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)、0.8  $\mu$ m の MMM (ボールライフサイエンス社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)、0.45  $\mu$ m 及び 0.8  $\mu$ m の PVD F (ミリポア社、米国マサチューセッツ州ベッドフォード、親水性フッ化ビニリデン樹脂) である。RNA は、実施例 8 において説明したのと同様に単離したが、この実施例では、単離ステップのスピンカラムに使用する膜の種類を変えている。詳細な収率 ( $\mu$ g-tcRNA/mg-脾臓) を、表 10 に示している。

【0137】

表 10: 収率

10

20

30

40

【表 10】

	$\mu\text{g}-\text{tcRNA}/\text{mg-脾臓}$
0.1 $\mu\text{m}$ BTS	2.6
0.2 $\mu\text{m}$ BTS	4.2
0.8 $\mu\text{m}$ BTS	5.0
0.45 $\mu\text{m}$ PVDF	1.6
0.8 $\mu\text{m}$ PVDF	1.8
0.8 $\mu\text{m}$ MMM	5.5

## 【実施例 10】

## 【0138】

## ゲノミックDNA汚染の比較

採取後すぐに液体窒素で急速冷凍したマウスの脾臓、脾臓、胸腺は、ヘルフリーズバイオロジカルズ社（米国アーカンサス州リジャース）から入手した。脾臓と胸腺の組織にはgDNAが大量に存在するため、これらの組織からRNAを単離するのは困難なため、本明細書に示す実施例では脾臓と胸腺の組織を選択している。実施例9に説明したのと同様に、RNAをこれらの組織から単離した。

## 【0139】

DNase「陽性」と示したサンプルについては、サンプルの重さを量り、OMNIT H組織ホモジナイザ（オムニ社、米国バージニア州フレントン）を用いて、15000rpmにて30秒間、過剰な溶解溶液（典型的には20倍過剰）中でパワーホモジナイズした。組織のホモジネート（典型的には300 $\mu\text{L}$ ~600 $\mu\text{L}$ ）を予備濾過カラムに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機（プリンクマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー）内で、16000 $\times g$ にて3分間遠心分離した。

## 【0140】

次いで、350 $\mu\text{L}$ の洗浄バッファース#2を用いてスピニングカラムを洗浄し、16000 $\times g$ にて2分間遠心分離して、微量の洗浄溶液を除去した。

## 【0141】

DNase（5ユニット）を、ピペットで24 $\mu\text{L}$ のDNase消化バッファースに加え、穏やかに混合した。この混合液を、ある程度精製したRNAを含むカラムの膜表面に加え、キャップを閉じて室温で15分間培養した。

## 【0142】

次いで、350 $\mu\text{L}$ の洗浄溶液#1を用いてスピニングカラムを1回洗浄し、16000 $\times g$ にて少なくとも10秒間遠心分離した。次いで、スピニングカラムを500 $\mu\text{L}$ の洗浄溶液#2で2回洗浄し、16000 $\times g$ にて少なくとも10秒間遠心分離した。その後、スピニングカラムを16000 $\times g$ にて2分間遠心分離し、微量の洗浄溶液を除去した。

## 【0143】

25 $\mu\text{L}$ のヌクレアーゼフリー水を用いてRNAを溶出させ、16000 $\times g$ にて1分間遠心分離した。その後、RNAを-70℃で保存した。

## 【0144】

比較のために、上記のようにマウスの脾臓をホモジナイズし、製造業者の指示に従って、QIAGEN RNeasy Mini Columnを用いての単離も行った。次いで、QIAGEN RNaseフリーDNaseセットを用いて、製造業者の指示に従って、サンプルをDNase消化した。

## 【0145】

ゲノミックDNA汚染物質は、実施例3に説明したのと同様に定量した。

## 【0146】

表1及び表2に戻ると、表1は、3つの組織に関する各条件下でのRNA収率を示しており、表2は、各々の中に含まれるgDNA汚染物質の濃度を示している。本発明の標準（-DNase）RNAに含まれるgDNAの濃度が低減していること、並びにオンカラ

10

20

30

40

50

△DNaseプロトコルを用いた場合にはさらに低減することが確認された。

【0147】

予備濾過とDNase消化を組み合わせて用いると、除去されるgDNAはやや増えるが、本発明の方法及び装置だけでも実質的に全てのgDNAを除去することができ、実験者は特定の用途において必要とされる場合には、DNase処理を避けることができる。

【0148】

従って、本発明による方法及び装置を用いることで、RNAが単離される元のサンプルからgDNAを効果的に除去し、DNase消化を不必要とし得る（しかし必要であればDNase消化と両立できる）ことが確認された。

【実施例11】

10

【0149】

#### 他の組織の単離

上記の単離精製法に加え、皮膚、心臓及び筋肉のような、結合組織及び構造タンパク質の多い組織からもまた、プロテイナーゼK処理によって容易にRNAを単離できる。

【0150】

まず始めに、そのような組織を上記のようにホモジナイズし、等量の水をサンプルに加える。次いで、プロテイナーゼKを加えて、最終的な濃度を1ユニット/100µLにし、混合し、55℃にて10分間培養することができる。次いで、本発明の予備フィルタカラムを用いてホモジエネートを遠心分離することができる（さらなる処理を実施してもよしなくてもよい）。この場合、上記のDNase処理を実施してもよいし実施しなくてもよい。

20

【0151】

特定の実施形態を参照して本発明を具体的に例示し、説明してきたが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細について種々の変更が可能であることが理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】本発明のSiCwカラムの概略図

【図2】本発明の予備フィルタカラムの概略図

【図3】RNA単離カラムの図

30

【図4】脾臓から単離されたRNAに関する、変性アガロースゲルを用いて得た結果

【図5】本発明の方法を用いて得た標準RNAとQiagen法により得たRNAを定量的RT-PCRにより比較したプロット図

【図6】本発明の方法を用いて得た標準RNAと、オンカラムDNase消化と共にQiagen法を用いて得たRNAを定量的RT-PCRにて比較したプロット図

【図7】本発明の方法を用いて得た標準RNAと、オンカラムDNase消化と共に本発明の方法を用いて得たRNAを定量的RT-PCRで比較したプロット図

【図8】種々のスピнкаラム膜から回収したRNA量

【図9】本発明の種々のガラスファイバフィルタを用いて種々の哺乳類の組織及び細胞培養物からRNAを単離した結果

40

【図10】植物組織からRNAを単離した結果

【図11】植物組織からRNAを単離した結果

【図12】単離したRNAのバイオアナライザ画像

【符号の説明】

【0153】

10 予備濾過スピнкаラム

12 ファイバフィルタ材

14、26、40 固定リング

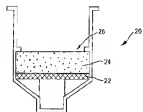
16、22、42 フリット

20 スピнкаラム

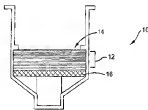
50

- 2 4 シリコンカーバイドウイスカ
- 3 0 単離カラム
- 3 2 注入口
- 3 4 排出口
- 3 6 チャンバ
- 3 8 ポリマー膜

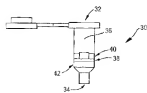
【図 1】



【図 2】



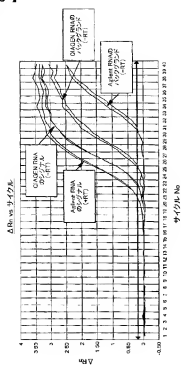
【図 3】



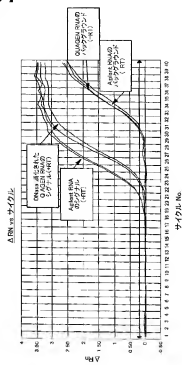
【図 4】



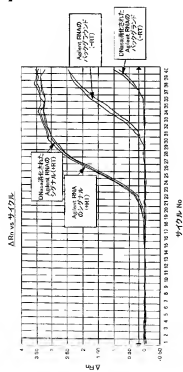
【 図 5 】



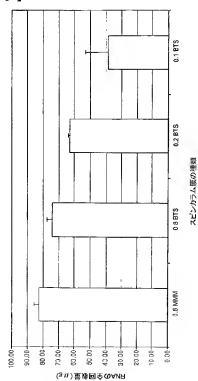
【 図 6 】



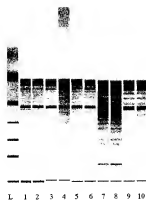
【 図 7 】



【 図 8 】



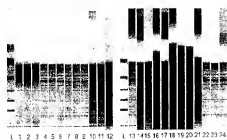
【図 9】



【図 11】



【図 10】



【図 12】





---

フロントページの続き

(72) 発明者 クラウディア・エイ・ロビンス

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 9 , ウィルミントン , サウス・ロード・ 1 1 2

(72) 発明者 ジョン・リンク

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 8 , ウィルミントン , バーバリー・ドライブ・ 2 2 6

(72) 発明者 バリー・イー・ボイエス

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 8 , ウィルミントン , ワーズワース・ドライブ・ 1 1 9

(72) 発明者 ローンダ・テイラー

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 9 7 7 , スミルナ , クリスティン・コート・ 1 3

F ターム(参考) 4E024 AA11 AA20 CA11 HA08 HA11

4E029 AA09 AA21 AA23 BB20 CC02 CC11 HA05

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-151975

(P2005-151975A)

(43) 公開日 平成17年6月16日 (2005. 6. 16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

4 B 0 2 4

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

4 B 0 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2004-223037 (P2004-223037)	(71) 出願人	399117121
(22) 出願日	平成16年7月30日 (2004. 7. 30)		アジレント・テクノロジーズ・インク
(31) 優先権主張番号	10/631189		AGILENT TECHNOLOGIE S, INC.
(32) 優先日	平成15年7月31日 (2003. 7. 31)		アメリカ合衆国カリフォルニア州パロアル ト ページ・ミル・ロード 395
(33) 優先権主張国	米国 (US)		395 Page Mill Road
(31) 優先権主張番号	10/693428		Palo Alto, California
(32) 優先日	平成15年10月24日 (2003. 10. 24)		U. S. A.
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087642
			弁理士 古谷 聡
		(74) 代理人	100076680
			弁理士 溝部 孝彦
		(74) 代理人	100121061
			弁理士 西山 清春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA単離用の方法と装置

## (57) 【要約】

## 【課題】

核酸を単離するための装置及び方法が開示される。詳細には、細胞トータルRNAの単離について検討されている。さらに、有害な汚染物質を導入せず且つ比較的時間を要さず、生物学的サンプル内のゲノミックDNAを低減させる方法を提供する。

## 【解決手段】

一実施形態では、サンプル内のRNAの完全性を維持しつつ、相当量のgDNAを除去する方法が開示される。この実施形態では、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも一つの層が充填されている予備濾過カラムが使用される。この実施形態では、組織/細胞溶解調製物が調製され、該調製物は予備濾過カラムに導入される。予備濾過カラム中をホモジェネートが通過する際、gDNAを含む細胞汚染物質はカラム内に残り、一方、流出物には部分的にtcRNAが含まれる。一態様では、サンプルに対してさらなる精製プロセス又は後段のプロセスを実施する前に、予備濾過カラムを使用することができる。

## 【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ゲノミック DNA を実質的に含まない RNA サンプルを調製する方法であって、

- (a) 生体サンプルから組織 / 細胞溶解物を形成するステップと、
- (b) 実質的に全ての gDNA を除去するステップと、
- (c) 前記 (b) の調製物に有機溶媒を加えて、沈殿物を形成させるステップと、
- (d) 前記 (c) の沈殿物を、膜を含む RNA 単離膜カラムに接触させるステップと、
- (e) 前記膜から、前記ゲノミック DNA を実質的に含まない沈殿物を収集するステ

ップと、

を包含する方法。

10

## 【請求項 2】

前記膜が、ポリマー膜である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ステップ (b) の実質的に全 gDNA を除去するステップが、予備濾過技術を使用することによって達成される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記溶解物が、カオトロピック剤を含む溶解バッファーを用いて形成される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記カオトロピック剤が、グアニジンイソチオシアネート、アンモニウムイソチオシアネート、塩酸グアニジン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記カオトロピック剤の濃度が、約 0.5 M ~ 約 5.0 M である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記生体サンプルが、動物及び植物の組織及び / 又は細胞からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記動物の組織及び / 又は細胞が、血液、尿、毛髪、皮膚、筋肉、骨、体液、臓器抽出物などからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記ステップ (e) の後に、デオキシリボヌクレアーゼ処理を実施する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記沈殿物が、実質的に DNA を含まない RNA からなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記溶解物が、βメルカプトエタノールを含む溶解バッファーを用いて形成される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記有機溶媒が、メタノール、エタノール、イソプロパノール、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアルコールである、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記ステップ (d) の後に、前記沈殿物を有機溶媒を含む洗浄溶液により洗浄する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記洗浄溶液が、洗浄バッファー # 1 及び洗浄バッファー # 2 からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記洗浄バッファー # 1 が、

50

- (a) 約 0.2 M ~ 約 2 M のグアニジンと、
  - (b) 約 5 % ~ 約 25 % のエタノールと、
  - (c) pH を約 6 ~ 約 9 に維持するバッファー剤と、
- からなる、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記洗浄バッファー # 2 が、

- (a) 約 40 % ~ 約 90 % のエタノールと、
  - (b) pH を約 6 ~ 約 9 に維持するバッファー剤と、
- からなる、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 17】

ゲノミック DNA を実質的に含まない RNA サンプルを調製する方法であって、

- (a) 生体サンプルから組織 / 細胞溶解物を形成するステップと、
- (b) ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも 1 つの層を有するファイバー材を備える予備濾過カラムに、前記溶解物を接触させるステップと、
- (c) 前記ステップ (b) の流出物に有機溶媒を加えて沈殿物を形成させるステップと

、

- (d) 前記ステップ (c) からの調製物を、膜を備える RNA 単離膜カラムに接触させるステップと、

- (e) 前記 RNA 単離膜カラムから、ゲノミック DNA を実質的に含まない沈殿物を収集するステップと、

を包含する方法。

## 【請求項 18】

前記ファイバー材が、約 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 約 10  $\mu\text{m}$  の範囲の粒子を保持する能力を有する、請求項 4 又は 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記ファイバー材が、約 50  $\mu\text{m}$  ~ 約 2000  $\mu\text{m}$  の範囲の厚さを有する、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記ファイバー材が、約 75  $\text{g} / \text{m}^2$  ~ 約 300  $\text{g} / \text{m}^2$  の範囲の比重を有する、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記 RNA 単離膜が、BTS、PVDF、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスルホン、MMM、PVP、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 2 又は 17 に記載の方法。

## 【請求項 22】

gDNA を実質的に含まない状態で RNA を単離するキットであって、

- (a) ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも 1 つの層を有するファイバー材を備える、少なくとも 1 つの予備濾過カラムと、

- (b) 膜を含む少なくとも 1 つの RNA 単離膜カラムと、

- (c) 前記 (a) 及び (b) のための試薬と、

- (d) 前記 (a) から (c) までを実施するための説明書と、

からなるキット。

## 【請求項 23】

前記 RNA 単離膜が、BTS、PVDF、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスルホン、MMM、PVP、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 2、19 又は 22 の何れか一項に記載のキット。

## 【請求項 24】

前記試薬が、少なくとも 1 つの有機溶媒と溶解バッファーを含む、請求項 22 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、概して、核酸のような生体物質を単離するための装置と方法に関する。より詳細には、本発明は、生体物質から細胞トータルRNAを単離することに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ハイブリダイゼーションアレイなどの遺伝子発現技術、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、クローニング、制限分析、配列決定をはじめとする多くの分子生物学的技術では、高純度の完全なRNAを投入する必要がある。RNAは、実験手順に干渉する可能性のある汚染物質を実質的に含まないものでなければならない。このような汚染物質としては、分子生物学で採用される、核酸もしくはタンパク質のハイブリダイゼーション、酵素触媒反応、及びその他の化学反応を阻害又は抑制する物質、目的の核酸又は他の生体物質の分解もしくは解重合を触媒する物質、分析されているサンプルに実際には存在していないのに、一定量のターゲット生体物質(例えば核酸)がサンプル内に存在すると示す、「バックグラウンド」を与える物質、が挙げられる。他の汚染物質としては、酵素、他の種類のタンパク質、多糖、ポリヌクレオチド、及び脂肪、又は低分子量酵素阻害剤、オリゴヌクレオチドなどの低分子量物質を挙げることができ。汚染物質はまた、対象とする物質を単離するために用いる化学物質又は他の物質からも系内に導入され得る。この種の汚染物質としては、微量金属、染料、有機溶媒が挙げられる。さらに典型的には、核酸は、組織、体液、培養物中の細胞、ターゲット核酸の増幅を行ったアガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル又は溶液などの複体系内に存在するため、核酸の単離は困難である。

## 【0003】

従って、後段の分子生物学的技術で利用できる程度に高純度且つ完全なRNAを調製するためには、多くの場合、ステップ数の多い大変なプロセスを必要とし、且つ従来の核酸単離プロセスには重大な欠点がある。このような欠点とは、フェノール(既知の発がん性物質)などの毒性のある化学物質、クロロホルム(非常に揮発性が高く毒性且つ可燃性である)などの揮発性の試薬などを使用する有機抽出ステップが含まれていること、並びに現在の方法は、オートメーション化又は高スループット化が困難なことである。さらに、有機溶媒抽出法を使用する場合には、規制対象であり、環境に配慮した方法で廃棄しなければならない有機性廃棄物が生じる。他の欠点は、所与の核酸材料を単離するために必要とされる抽出ステップの数が多く、時間を要することである。従って、理想的な環境及び条件下であっても、ほとんどの従来の核酸単離方法は、時間を要し、危険で、しかも単離される核酸物質の収率が比較的低いといった問題を有していた。

## 【0004】

上述のような従来の単離技術に取って代わるものとして、又は従来の単離技術を補足するものとして開発された市販の単離システムにおいては、多くの場合、核酸結合基材として珪酸ファイバー又はガラスファイバーからなるフィルタが使用されている。核酸は、ガラススラリーや珪藻土などのシリコン含有物質に結合することがよく知られている。これらの物質のいくつかが抱える問題点は、必要な珪酸材料が常に適切な形態で市販されているわけではないこと、また、多くの場合、オンサイトで調製しなければならないため、核酸単離手順に時間と手間を要することである。

## 【0005】

少なくとも数種の生体物質からトータルRNAを単離するために使用し得る、シリカベースのシステム及び方法もまた、ここ数年の間に、既に開発されている。それら既知のシリカベースのRNA単離技術では、同一の基本的な一連のステップに基づいて、任意の所の生体材料からターゲットRNAが単離される。とはいえ、各手順で用いられる種々の溶液の濃度及び量は、使用するシリカベースの材料組成によって変更される。一般に、それら既知の全てのシリカベースRNA単離プロセスにおいて用いられる基本的な一連のステップには、溶解バッファー存在下で生体物質を分解するステップ、核酸(複数可)と「

シリカベースの基質」との複合体を形成するステップ、得られた複合体から溶解バッファ一混合液を除去し複合体を洗浄するステップ、複合体からターゲットの核酸を溶出させるステップが包含される。一般に、「シリカベース」という用語は、 $\text{SiO}_2$ 化合物、及びこれと同類の水和酸化物を記述するために用いられる。

【0006】

近年、核酸をシリコンカーバイド粒子に結合するステップ、次いで核酸をシリコンカーバイドから溶出させるステップを含む、DNA及びRNAの精製方法も開発されている。ここで、シリコンカーバイドは、上記のような「シリカベース」ではなく、「シリカベース」として定義されるどの組成物にも含まれないことに注意されたい。

【0007】

市販の種々のキットによって、種々の生体物質からDNA又はRNAを単離する比較的迅速な手段がもたらされるが、特にRNAを生体源から単離する場合には、シリカベースの核酸単離キットを使用することには限界のあることが知られている。特に少数の細胞からのサンプルを処理する場合、又は、哺乳類の脾臓組織、脾臓組織、肺組織など一部の困難な組織からRNAを単離する場合などには、それら複雑な生体サンプル内のRNA純度は低く、完全なRNAの回収は困難である。

【0008】

RNA単離における一般的な汚染物質は、ゲノミックDNA (gDNA) である。一部の市販のRNA単離キットは、デオキシリボヌクレアーゼI (DNase I) を用いて、選択的に汚染物質であるgDNAを酵素の働きにより除去するプロトコルを提供している。しかしながら、DNase I処理を実施すると、商業生産されているDNase Iにはリボヌクレアーゼ (RNase) が混在している可能性があるため、RNAの収率が低下し、RNAの質が低下し得る。また、DNase I処理を用いると、実験時間が長くなり、処理に必要な時間が延長される。さらに、DNase I処理は、後段のプロセスと干渉しかなない金属イオンの添加を必要とする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

よって、実施手順全体に要する時間があまり長くなり、特殊な処理が必要となる危険な廃棄物を生成せず、タンパク質、脂質、gDNA、又は後段の処理もしくは解析を阻害、干渉する可能性のある任意の化学物質などの汚染物質を実質的に含まない単離RNAをもたらし、容易で、迅速で、安全な方法及び装置が必要とされている。さらに、非シリカベース材料を用いて核酸を濃縮及び単離する方法であって、現在の非シリカベースの方法よりも高いRNA収率をもたらし、容易で、迅速で、安全で、効果的な方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一実施形態では、サンプル内のRNAの完全性を維持しつつ、相当量のgDNAを除去する方法が開示される。この実施形態では、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーからなる少なくとも1つの層が充填されている予備濾過カラムが使用される。この実施形態では、組織/細胞溶解調製物が調製され、該調製物は予備濾過カラムに導入される。予備濾過カラム中をホモジェネートが通過する際、gDNAを含む細胞汚染物質はカラム内に残り、一方、流出物にはある程度精製されたtcRNAが含まれる。一態様では、サンプルに対してさらなる精製プロセス又は後段のプロセスを実施する前に、予備濾過カラムを使用することができる。

【0011】

他の実施形態では、複雑なサンプル基質から核酸を単離する方法が開示される。本発明の特定の実施形態では、核酸はRNAである。この方法では、カオトロピック剤によりサンプル基質が破壊される。次いで、tcRNA単離をはじめとする後段のプロセスを最適化するため、有機溶媒がサンプルに加えられる。次に、この調製物を、例えばシリコンカ

10

20

30

40

50

ーバイドカラムなどの本発明のカラムに導入することができる。特定の実施形態では、カラムはシリコンカーバイドウイスカー(「SiCw」)カラムである。調製物がカラムを通過して流出した後に、その流出調製物を洗浄することによって、カラム内に残留することなく流出物中に混在している汚染物質を流出調製物から除去し得る。最終的に、所望の核酸製品をカラムから溶出させ単離することができる。

#### 【0012】

他の実施形態では、予備濾過カラムと、SiCw又は「シリカベース」カラムなどの単離カラムとを共に用いて、核酸を単離する。本実施形態では、組織/細胞溶解物を調製し、次いで予備濾過を実施する。この予備濾過ステップでは、予備濾過スピンカラムを使用する。予備濾過スピンカラムの例としては、限定はしないが、ガラスファイバークラム又はホウケイ酸カラムが挙げられる。この実施形態の一態様では、gDNAが予備濾過カラム基材中に残り、RNAが流出する。さらに、流出物中のRNAをDNaseを用いて処理し、予備濾過ステップで完全に除去されなかったDNAを分解することができる。RNA含有流出物を単離カラムにかけ、流出物からRNAを精製する。任意に、単離カラム内に捕獲されているRNAをデオキシリボヌクレアーゼ処理することにより、gDNAを除去することができる。いずれの場合でも、次いで、RNAを少量溶出させることができる。

10

#### 【0013】

さらに別の実施形態では、本発明はシリコンカーバイドからなる装置に関する。特定の態様では、サンプル基質から核酸を単離するための核酸結合カラムとしてSiCwカラムを用いる。一態様ではSiCwがRNAと結合する。

20

#### 【0014】

本発明の一実施形態では、注入口、排出口、及び注入口と排出口の間にあるチャンバを備えるRNA単離膜カラムが開示される。チャンバの中には、ポリマー膜からなる単一又は複数の層がある。ポリマー膜の例として、ポリスルホン、PVDF、BTS、ナイロン、ニトロセルロース、PVP(ポリ(ビニルピロリドン))、及びそれらの混合物が挙げられる。当該RNA単離カラムは、さらに、固定リングとフリットを備え、これらは両方とも膜の周囲に配置されている。固定リングは注入口近傍に配置され、フリットは排出口近傍に配置される。

30

#### 【0015】

本明細書では、当該RNA単離膜カラムを用いるRNAの単離法もまた開示される。まず、サンプル基質を調製する。サンプル基質は、動植物の組織及び細胞を含み得る。組織及び/又は細胞は、当分野で周知の方法を利用して、生物から得ることができる。その調製物を溶解させ、組織及び細胞内部の成分を露出及び/又は放出させる。一態様では、溶解調製物を予備濾過カラムにかけることができる。好ましくは、カラムを遠心分離するか又は真空にして、溶解物をガラスファイバークラムからなる予備フィルタカラムを通過させる。この遠心分離の間、「層」は形成されない(即ち、ベレットは生じない。即ち、相分離は起こらない)。遠心分離後、アルコールを調製物に添加することができる。アルコールを含む調製物を、本発明のRNA膜単離スピンカラムに導入(装填)することができる。カラムは、例えばMMM膜のような少なくとも1つのポリマー膜を含む。前記アルコール含有調製物をカラムに導入したら、遠心分離する。フロースルー(カラムに吸着しなかった物質)を廃棄し、スピンカラムを少なくとも1回洗浄する。元のサンプル基質由来のRNAを、ヌクレアーゼフリー水又は他の温和な低イオン強度溶液を用いて溶出させることができる。

40

#### 【0016】

キットもまた、本発明の一実施形態である。本発明のキットは、少なくとも1つの予備濾過カラムを含む。一態様では、予備濾過カラムは、ガラスファイバークラム又はホウケイ酸ファイバークラムなどのファイバークラムから構成されている。キットはまた、少なくとも1つのRNA単離膜カラムを含む。試薬もまた、本実施形態のキットの一部である。当該試薬には、少なくとも1つの有機溶媒と少なくとも1つの溶解バッファーとが含まれる(上述した溶

50

解バッファーなど)。他の試薬をキット内に含めることもできる。このような試薬には、膜で単離したRNAを洗浄し、さらに汚染物質(コンタミネント)を除去するか、t c RNAを収集する間に、残存する溶解試薬の濃度を低減させるために用いられる試薬が含まれ得る。実験者が本発明を実施するための説明書も含まれている。

#### 【発明の効果】

##### 【0017】

本発明によれば、核酸、特に細胞トータルRNA(t c RNA)を単離する装置及び方法を提供することができる。さらに、本発明によれば、有害な汚染物質を導入することなく、またサンプルに対して実施する手順全体に要する時間をそれほど延長させることなく、生体サンプル内のg DNAを低減させる、装置及び方法を提供することができる。

10

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0018】

本発明は、核酸を単離するために使用される装置及び方法に関する。特に、本発明はt c RNAの単離に関する。関連する方法では、本発明は、有害な汚染物質を導入することなく、また、サンプルに対して実施する手順全体に必要となる時間をそれほど延長させることなく、生体サンプル内のg DNAを低減させる、装置及び方法に関する。

##### 【0019】

本発明は、複雑なサンプル基質から核酸を単離する方法に関する。本発明の特定の態様では、核酸はRNAである。別の態様では、RNAはt c RNAである。本発明の生体サンプルには、限定はしないが、動物、植物、バクテリアなどの真核生物又は原核生物から得られる細胞及び組織が含まれる。一態様では、動物は哺乳類であってもよく、さらに別の態様では、哺乳類はヒトであってもよい。例えば、植物、イースト菌、真菌、ウイルスなど他のサンプルも考え得る。さらに、サンプルは、例えばポリメラーゼ連鎖反応又は酵素重合反応などの実験プロトコル由来の生成物、アガロースゲルなどの培地に存在する核酸などであってもよい。サンプル基質は、単一鎖又は二重鎖のRNA及びDNAなど、単一鎖又は二重鎖の核酸を含んでいてもよい。また、変性された核酸も本発明の範囲に包含される。

20

##### 【0020】

本発明の予備濾過法及び装置では、g DNA汚染物質を除去するだけでなく、同時にサンプルをホモゲナイズ(均質化)する。g DNA除去とホモゲナイズとを同時に実施することは、通常は溶解とホモゲナイズとが、パワーホモゲナイズ処理などの単一ステップでは完了しないサンプルにとって、特に有利である。例えば、細胞培養物は、典型的には、当分野で既知の溶解溶液により、細胞培養容器又はチューブ内で溶解する。溶解した細胞培養液サンプルのホモゲナイズに失敗すると、サンプルの粘性が高まり、RNAの収率が低下又は変化し得る。従って、本発明の溶解とホモゲナイズとを同時に行う処理によって、他のホモゲナイズステップの必要性、並びにホモゲナイズステップの不実施に伴う問題、を回避することができる。

30

##### 【0021】

本発明の方法により、高度に精製された完全な細胞トータルRNA(t c RNA)が得られる。精製されたt c RNAとは、サンプル基質由来の汚染物質、並びにプロセス由来の汚染物質が本質的に完全に除去されたt c RNAと定義される。これらの汚染物質には、カオトロピック塩、非カオトロピック塩、アルコール、g DNA、タンパク質、脂質、糖質、その他の細胞の残骸が含まれる。汚染物質の検出アッセイとしては、限定はしないが、電気泳動法、分光光度法、PCR又は逆転写などの機能アッセイが挙げられる。

40

##### 【0022】

一般に、核酸単離の最初のステップは、当分野で周知の方法を用いてサンプルを破壊し、サンプル内に含まれる細胞を溶解させることである。本発明の一態様では、単離すべき核酸は、t c RNAである。高純度の完全なRNAの例には、P. ChomczynskiとN. Sacchiによる、「Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanat

50



e - Phenol - Chloroform Extraction」, Anal. Biochem., 162 (1) : 156 - 9 (1987年4月)、及び、Chomczynskiによる米国特許第4,843,155号において説明されている方法が含まれる。これらの内容は、参照すること、本明細書に取り入れることとする。その他の方法として、F. Ausubel他編、「Current Protocols in Molecular Biology」, Wiley - Interscience, New York (1993年)の第2章(DNA)、第4章(RNA)に説明されている方法を挙げることで、参照すること、その内容の全てを本明細書に取り入れることとする。

#### 【0023】

種々の種類の生体材料からトータルRNAを単離する溶解及び有機抽出法の例に関しては、Sambrookらによる、「Molecular Cloning」, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, P. 7.3以下参照(1989); Promega Corporationによる、「Protocols and Applications Guide」, 3<sup>rd</sup> edition, p. 93以下参照(1996); Chirgwin J.M.らによる、18 Biochemistry 5294 (1979)参照。また、従来の技術及びシリカベースの技術に関しては、米国特許第6,218,531号を参照されたい。参照することで、これらの教示内容の全てを本明細書に取り入れることとする。

#### 【0024】

本発明では、1つ又は複数のカオトロピック塩を使用する。カオトロープには、例えば、グアニジンイソチオシアネート、アンモニウムイソチオシアネート、グアニジン塩酸塩を用いることができる。当業者であれば、他のカオトロープも本発明の範囲内で使用できることが理解されよう。典型的には、カオトロープの濃度は、約0.5M-約5.0Mの範囲である。重ねて、これらの濃度は、当業者には既知の、サンプル基質などの要因に応じて変更することができる。カオトロピック剤は、例えば、タンパク質を変性させるために、又は、分子間の相互作用を抑制するために、又は、重要なことには、スクレアーゼ(存在すると、対象とする核酸を劣化させてしまう)の作用を抑制するために、用いられる。いくつかの方法を用いて、プロセス全体にわたる核酸の完全性をモニタリングすることができ、その最も一般的な方法は、電気泳動法やRT-PCRアッセイである。

#### 【0025】

ホモジェネートは、当業者に周知の方法によりサンプル基質を破壊し、サンプル基質に含まれる細胞を溶解させることで形成される。当該ホモジェネートは、さらに処理することができる。

#### 【0026】

さらなる処理の例には、シリコンカーバイド粒子を用いて核酸を単離する方法に関して説明している、Haj-Ahmadによる米国特許第6,177,278号及び第6,291,248号に記載の処理が含まれる。参照すること、これらの特許の記載内容の全てを本明細書に取り入れることとする。Haj-Ahmadが説明している、核酸単離法では、比較的低い比表面積( $m^2/g$ )のシリコンカーバイド粒状物、即ち、無孔性の、不規則な形状を有する粒子の集合が使用されている。

#### 【0027】

シリコンカーバイドの代替物として、ガラス粒子、ガラス粉末、シリカ粒子、ガラスマイクロファイバー、珪藻土、及びこれらの化合物の混合物、のようなシリカ材料を、カオトロピック塩水溶液と組み合わせて使用することで、核酸を単離する。

#### 【0028】

Haj-Ahmadが開示した方法とは対照的に、本発明の方法は、溶解調製物を予備濾過スピンカラムに導入し、精製ホモジェネートを得るステップを包含する。溶解溶液は、好ましくは、カオトロピック塩、及び/又はターゲット核酸の分解や収率低下を防止する添加物を含む。一態様では、予備濾過カラムは、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーカラムである。一態様では、本発明のファイバーには、結合剤は含まれない。結合

10

20

30

40

50

剤を含まないファイバーの例は、「純水ウケイ酸」である。別の態様では、使用するファイバーは結合剤を含んでいてもよい。結合剤を用いることで、固相の濾過剤の取り扱いが容易になる。結合剤はまた、複合材料の特性を変性させるために採用されたプロセスの結果存在することもある。このようなプロセス要素は、ターゲット核酸の最適収率及び純度にとの適合性に応じて選択しなければならない。このような結合剤の例として、限定はしないが、アクリル、アクリル樹脂、又はプラスチック樹脂が挙げられる。結合剤は、典型的には、ファイバーフィルタ重量の5%を占めるが、この割合は変更し得る。

【0029】

本発明の他の態様では、有機溶媒が添加される。例えば、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどの低分子量アルコールを、容積で約50%~80%添加する。当該有機溶媒によって、ターゲット核酸の純度が向上したり、及び/又は回収率が向上する。

【0030】

予備濾過ステップでは、gDNA及び他の汚染物質がスピнкаラム中に残留し、所望のRNAは流出物中に含まれる。任意に、この流出物をDNaseで処理することで、カラム内に残留することなく流出物中に混在しているDNAが分解される。

【0031】

本発明のファイバーフィルタ材は、約0.1 $\mu\text{m}$ ~約10 $\mu\text{m}$ の直径に相当する粒子保持能を有する。本発明のファイバー材の厚さは、約50 $\mu\text{m}$ ~約2000 $\mu\text{m}$ の範囲とし得る。例えば、典型的なファイバーフィルタの厚さは、約500 $\mu\text{m}$ である。ファイバーフィルタの比重は、典型的には、約75g/m<sup>2</sup>~約300g/m<sup>2</sup>の範囲である。複数のファイバー層からなる実施形態もまた、本発明の範囲内である。

【0032】

図1に、本発明の典型的なSiCwカラムの一例を示している。この図には、中にフリット22が配置されているスピнкаラム20を示している。フリット22上には、シリコンカーバイドウィスカー24が配置されている。材料を固定するために、また、シリコンカーバイドウィスカー24が過剰に膨潤するのを防ぐために、シリコンカーバイドウィスカーの土台に隣接して固定リング26が配置されている。

【0033】

当該シリコンカーバイドウィスカーは、核酸を単離するために、比較的高い比重を有する。表面窒素吸着法で測定した場合、本発明に用いているSiCwは、3.9g/m<sup>2</sup>/gであり、一方、Ha j - A h m a d の材料は0.4g/m<sup>2</sup>/gである。ウィスカー技術は、複雑なサンプルから、特にRNAなどの核酸を単離することに関して効果的に機能する。本発明の方法と、Ha j - A h m a d により開示された方法との重要な差異は、Ha j - A h m a d が開示したRNA単離プロセスでは、完全なRNAは得られず、gDNAを除去する方法も包含されていないことである。

【0034】

上述のように、SiCwスピнкаラムにサンプルが導入されると、次いで、当該カラムを、遠心分離されることになる収集管内に配置するか、又は真空マニホールド上に乗せることができる。次いで、スピнкаラムをマイクロ遠心分離機で遠心分離するか、又はマニホールドを真空にすることで、サンプル調製液がスピнкаラム内のSiCwフィルタを通過し、そして収集チャンバに入る。このとき、予備濾過プロセスで除去されなかった殆どの核酸、即ちRNA及びgDNAは、SiCwスピнкаラム領域に残留する。実施例セクション中の表5及び表6を参照されたい。

【0035】

任意に、サンプル調製物をスピнкаラムに導入するステップの後段ステップとして、汚染物質を除去する洗浄処理と任意選択の酵素処理を実施することができる。例えば、このような処理は、DNase (DNase I 又は II) を用いて実施することができる。サンプル結合後のDNase処理により、残りのgDNA汚染物質を除去することができるが、このような処理が必要とされない場合もある。DNase I が最も一般的に使用されるDNaseであるが、DNase II もまた使用できる。DNase II は、脾臓から

10

20

30

40

50

単離される酵素であって、肝臓から単離されるDNase Iと比較すると、見掛けの分子量、最適pHなどにおいて幾分異なる性質を有しており、異なる塩基を認識し切断するものと考えられる。しかしながら、どちらの酵素も、RNase不含有の状態にて市販されており、このことは、DNase消化後に完全なRNAを得るために重要である。DNase処理を実施する場合は、ホモジネートをカラムに通過させた後、カラムは、例えば少なくとも0.5Mの濃度のグアニジンソチオシアネート、アンモニウムソチオシアネート、グアニジン硫酸塩などのカオトロピック塩と、約5%～約10%のメタノール、エタノール、イソプロパノールなどの低分子量アルコールを含む洗浄バッファー#1により1回洗浄し、次いで、約6～約9のpHに中和することができる。例えば、RNaseフリーDNase含有中和溶液(pH6～9、塩化カルシウム及び塩化マグネシウム(又は硫酸塩、塩化マンガン)を含有している)を、サンプルが結合している基材に添加し、約25℃～約37℃の温度で少なくとも5分間培養する。

10

【0036】

この培養の後、洗浄バッファー#1をカラム内のホモジネートに添加する。次いで、カラムを遠心分離するか、及び/又はカラムを真空にする。

【0037】

洗浄バッファー#1により洗浄した後、25mM、pH7のトリス塩化水素(米国テキサス州オースティン、アンピオン社)と、70%エタノール(米国ミズーリ州セントルイス、シグマ社)とを含んで成る洗浄バッファー#2により2回続けて洗浄することができ。典型的には、洗浄バッファー#2は、例えば、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどの低分子量アルコールを、約50vol%～80vol%含んでいる。

20

【0038】

上記のように、遠心分離及び/又は真空除去のいずれにおいても、洗浄溶液を除去することができ。遠心分離及び/又は真空手順により、カラム材料からアルコールの大部分が除去される。

【0039】

DNase消化を実施しない場合は、サンプルを濾過カラムに通過させた後、洗浄バッファー#1によりカラムを少なくとも1回洗浄し、次いで洗浄バッファー#2を用いて洗浄する。洗浄後、カラムから対象物質を溶出させる。例えば、SiCwカラムを使用する場合には、最後のステップは、単離され精製された核酸、例えばtcRNAを、SiCwカラムから溶出させることである。SiCwカラムから溶出させるのに用いる溶液は、一般に低いイオン強度を有し、100mM未満であり、pHは約6.0～約8.5である。このような溶液の2つの例として、10mMのEDTA及び10mMのクエン酸ナトリウムを挙げることができる。

30

【0040】

さらに、2回目の単離を実施することができる。SiCw(又は他の結合)カラムからの全溶出液に、DNase消化を実施することができる。次いで、異なるカラムを用いて、洗浄ステップを含む精製を実施することができる。溶出後に、DNase消化を実施する場合は、全サンプルを用いて同じ収集管内で実施することができ、又はアリコートを除去することができる。典型的には、類似のバッファー条件下では、溶出後に実施されるDNase反応では、より少ない量のDNase酵素を使用する。溶出後のDNase消化は、37℃にて、溶出前に実施する15分間のDNase消化よりも短い時間実施することができ。EDTAにより反応を終了させることができ、酵素を例えば65℃の熱で不活性化したり、及び/又はフェノール/クロロホルム抽出などをはじめとする追加の精製手順を実施することができる。

40

【0041】

図2は、本発明の予備濾過スピカラム10の典型的な実施形態を示している。本発明の特定の態様では、予備濾過カラムは、ファイバーフィルタ材12からなる少なくとも1つの層(この図では複数の層が図示されている)と、ファイバーフィルタ材の第1の面に隣接して配置されている固定リング14とを備える。固定リング14は、ファイバーフィ

50

ルタ材 12 の層を固定し、サンプルを加えたときにファイバフィルタ材 12 が過剰に膨張するのを防止する。図 2 には、ファイバフィルタ材 12 の第 2 の面に隣接して配置されているフリット 16 もまた描かれている。一態様では、フリット 16 は、細孔径が約  $90\mu\text{m}$ 、厚さが  $1.5\text{mm}$  のポリエチレンから構成される。フリット 16 は、ファイバフィルタ材 12 が変形しないように機械的支持をもたらし機能を有する。

#### 【0042】

本発明の別の態様では、流出調製物を、例えば本発明のシリコンカーバイドウイスカラム (図 1) をはじめとするシリコンカーバイドカラムなどの濾過カラムを用いて、さらに精製する。サンプルを本発明のファイバフィルタを用いて予備濾過した後に、サンプルに対して任意の手順を実施することができ、例えば、ホモジェネートを導入した SiCw カラムを遠心分離ユニット内の収集管に入れるか、及び / 又は真空マニホールド上に配置することができる。シリコンカーバイドウイスカラムをマイクロ遠心分離で遠心分離するか ( $16000 \times G$  にて 2 分)、及び / 又はマニホールドを真空にすることができ、流出物を SiCw フィルタを通過させて収集チャンバに入れる。目的のターゲット核酸はほとんどシリコンカーバイドウイスカーと結合しカラム内に残留する。特定の態様では、目的の核酸は RNA である。より特定の態様では、RNA は tcrRNA である。

#### 【0043】

本発明の方法及び装置を利用する RNA 単離キットの、予めパッケージ化された構成要素又は個別に入手可能な構成要素も、本発明の範囲内である。典型的なキットとして、収集管と共にバックされたファイバ予備フィルタ、収集管と共にバックされた SiCw スピнкаラム、又はプラスチック製品 (実験者がスピнкаラムをバックするのに用いられる) と共にバックされた SiCw スラリー、又は実験者がスラリー化させバックするための乾燥 SiCw、洗浄バッファ #1 及び #2 を含む試薬、エタノールと  $\beta$ -メトカプトエタノールなどのアルコール、溶出用収集管を挙げることができる。キットはまた、DNAse 及び / 又はプロテイナーゼ K と共に準備又は組み立てることができ、キットを構成する構成要素は、別々に入手できるようにすることもできる。

#### 【0044】

本発明の一実施形態では、注入口 32、排出口 34、及び注入口と排出口の間のチャンバ 36 を備える RNA 単離カラム 30 を開示する。チャンバの中には単一の層又は多数の層からなるポリマー膜 38 があり、当該ポリマー膜の例として、ポリスルホン、PVP (ポリ (ビニルピロリドン))、MMM 膜 (ポールライフサイエンス社)、BTS、PVD、ナイロン、ニトロセルロース、及びそれらの混合物が挙げられる。膜は、ポリマーである必要はない。また、固定リング 40 とフリット 42 が、膜 38 の周囲に配置されている。固定リング 40 は注入口 32 近傍に配置され、フリット 42 は排出口 34 近傍に配置される。

#### 【0045】

本発明の 1 つの重要な特徴は、ポリマー膜には、高 pH での溶解又は不可逆的な吸収のような、シリカベースのカラムにみられる限界がないことである。

#### 【0046】

本発明の RNA 単離膜カラム 30 を利用することで、実験者は、「導入」又は「スピニング (又は遠心分離)」毎に、 $5\mu\text{L} \sim 700\mu\text{L}$  のサンプルを注入口 32 を介してカラム 30 に加えることができる。本発明のカラム 30 にサンプルを加える前に、例えばカオトピック剤を用いてサンプル基質を破壊し、遠心分離することができる。必要があれば、実験者は、調製物に 1 種又は複数種の有機溶媒を加えることもできる。例えば、25% ~ 100% のアルコールを、体積比で 0.25 から 1 の量にて加え、遠心分離することができる。沈殿物は膜によって収集され、遠心分離時に収集管内に収集された「フロースルー」は容易に取り除くことができる。これらの予備的なステップの後に、サンプル調製物を RNA 単離膜カラム 30 に加えることができる。流出物 (フロースルー) をカラム内を通過させ、次いで、洗浄バッファ #2 により洗浄することによって、汚染物質がカラムから容易に除去できる。このプロセスによって、所望の RNA は、1 つ又は複数の膜 38 の表

面に沈殿している。次いで、当分野で周知の方法を用いて、RNAを収集することができる。

#### 【0047】

有機溶媒を加える前に、任意に、サンプル基質を(ガラス又はホウケイ酸)ファイバー予備濾過カラムに導入することができる。これによって、gDNA汚染物質は、市販されているシリカベースのキットを用いる方法より低減される(米国特許出願第10/631,189号参照。参照することで、その内容の全てを本明細書に取り入れることとする)。オンカラムDNase消化を利用すると、gDNAをさらに低減させることができる。この消化は任意選択的に実施され、gDNA低減のために必ずしも必要とされるものではない。汚染物質であるgDNAは、直接定量化PCRアッセイを用いて定量化する。

10

#### 【0048】

本発明の利点として、限定はしないが、ステップ数が少ないためサンプル調製時間を短縮し得ること、溶出容積が少ないため濃縮サンプルが得られること、また例えばガラスファイバー予備濾過カラムを用いてgDNAを予め除去することによってゲノミックDNA(gDNA)汚染が低減されること、が挙げられる。本発明のRNA単離には、フェノールやクロロホルムのような毒性物質又は腐食性物質は必要とされないが、実験者がこのような物質を使用することを選択した場合には、このような物質も使用でき、このような態様も本発明の範囲内である。

#### 【0049】

本発明を使用して単離したRNAを、QIAGEN RNeasy Mini Kit(20  
キアゲン社、米国カリフォルニア州バレンシア、部品番号74104)などの市販の方法を用いて単離したRNAと比較した結果を、表1~表4に示している。任意選択のオンカラムDNase消化を実施する場合と実施しない場合について示している。これらのデータから、本発明のカラム及び方法を使用することで、十分に同等な量のRNAが単離され、しかもgDNA汚染が低減されていることが分かる。さらに、単離困難なサンプルに関しても、本発明で得られるRNAは高品質である。これを表す変性アガロースゲルを図4に示している。本発明の方法又はQIAGEN RNeasy Mini Kitを使用して単離された脾臓RNAを、任意選択のオンカラムDNase消化を実施した場合と実施しない場合の両方に関して、図4に示している。レーン1~3は、本発明により得られた標準サンプルであり、レーン4~6は、本明細書に開示した方法を用いてDNase処理されたサンプルであり、レーン7~9は、QIAGEN法により得られた標準サンプルであり、レーン10~12は、QIAGEN法を用いてDNase処理したサンプルである。QIAGEN法により得られたRNAを含むレーンでは、低分子量のスミア(smea30  
r)があり、これは、RNAが分解されていることを示している。本発明の方法により得られたRNAを含むレーンでは、低分子量のスミアはなく、リボソームRNAバンドの28S:18S特性比は2:1である。

#### 【0050】

表1: オンカラムDNase消化プロトコルと共に0.8µmのMMMカラムやQIAGEN RNeasy Mini Kitを用いた場合の、マウスの脾臓、脾臓及び胸腺(40  
ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース)からの典型的収率

#### 【表1】

260nmにおける吸光度から定量された収率(µg-tcRNA/mg-組織)

	本発明		QIAGEN 法	
	標準 (-DNase)	+DNase	標準 (-DNase)	+DNase
脾臓	12.5 µg/mg	11.5 µg/mg	13 µg/mg	12.8 µg/mg
脾臓	3.2 µg/mg	3.1 µg/mg	2.4 µg/mg	2.8 µg/mg
胸腺	4.3 µg/mg	4.4 µg/mg	3.4 µg/mg	3.2 µg/mg

#### 【0051】

表2: オンカラムDNase消化プロトコルと共に0.8µmのMMMカラムやQIAGEN RNeasy Mini Kitを用いた場合の、マウスの脾臓、脾臓及び胸腺(40  
ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース)からの典型的収率

50

G E N R N e a s y M i n i K i t を用いた場合の、マウスの脾臓、脾臓及び胸腺 (ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース) からの典型的純度

【表 2】

直接定量 PCR アッセイによって得られた、gDNA 汚染の観点からの純度  
(pg - gDNA/ ng - サンプル)

	本発明		QIAGEN 法	
	標準 (-DNase)	+DNase	標準 (-DNase)	+DNase
脾臓	$1.4 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$	$5.2 \times 10^3$	$6.4 \times 10^3$
脾臓	$2.7 \times 10^1$	$3.1 \times 10^1$	$2.9 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$
胸腺	$8.3 \times 10^1$	$1.8 \times 10^1$	$9.2 \times 10^1$	$2.7 \times 10^0$

10

【0052】

表 3 : 0.8 μm の MMM カラムや Q I A G E N R N e a s y M i n i K i t を用いた場合の、種々の冷凍マウス組織 (ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース) からの典型的収率

【表 3】

直接定量 PCR アッセイによって得られた、gDNA 汚染の観点からの純度  
(pg - gDNA/ ng - サンプル)

	低負荷		高負荷	
	本発明	QIAGEN 法	本発明	QIAGEN 法
脳 (2.5, 30mg)	$1.2 \times 10^0$	$1.1 \times 10^2$	$1.6 \times 10^0$	$7.2 \times 10^0$
肝臓 (2.5, 30mg)	$2.8 \times 10^2$	$1.3 \times 10^1$	$1.3 \times 10^1$	$3.7 \times 10^1$
腎臓 (2.5, 30mg)	$2.1 \times 10^1$	$5.5 \times 10^1$	$8.9 \times 10^1$	$1.5 \times 10^0$
脾臓 (2.5, 15mg)	$2.1 \times 10^1$	$1.9 \times 10^2$	$2.0 \times 10^1$	$4.2 \times 10^1$
HeLa 細胞 ( $5 \times 10^5$ , $4 \times 10^6$ )	$6.8 \times 10^2$	$6.8 \times 10^1$	$1.9 \times 10^0$	$1.2 \times 10^1$

20

【0053】

表 4 : 8 層ガラスファイバー予備濾過カラムを用いて予備濾過後、0.8 μm の MMM カラムや Q I A G E N R N e a s y M i n i K i t を用いて単離した場合の、冷凍マウス組織 (ベルフリーズ社、米国アーカンサス州ロジャース) からの典型的収率

【表 4】

260 nm における吸光度から定量された収率 (μg - tcRNA/ mg - 組織)

	低負荷		高負荷	
	本発明	QIAGEN 法	本発明	QIAGEN 法
脳 (2.5, 30mg)	0.6 μg/mg	0.6 μg/mg	0.8 μg/mg	0.8 μg/mg
肝臓 (2.5, 30mg)	4.6 μg/mg	5 μg/mg	4.5 μg/mg	4.6 μg/mg
腎臓 (2.5, 30mg)	2.3 μg/mg	2.9 μg/mg	2.7 μg/mg	2.7 μg/mg
脾臓 (2.5, 15mg)	3.1 μg/mg	2.5 μg/mg	3.7 μg/mg	2.1 μg/mg
HeLa 細胞 ( $5 \times 10^5$ , $4 \times 10^6$ )	13.8 μg/mg	22.8 μg/mg	15.5 μg/mg	16 μg/mg

40

【0054】

gDNA 汚染の低減は多くの分子生物学アッセイにとって重要であり、特に定量的 RT - PCR では重要である。RT - PCR は、一般に 2 ステップからなる反応又はアッセイであり、第 1 のステップは、逆転写酵素反応により cDNA テンプレートを生成することである。第 2 のステップは、Taq ポリメラーゼのような DNA ポリメラーゼによって P

50

CRを生成することである。グノミックDNA汚染物質は、定量的RT-PCR用途においてバックグラウンドの増加を引き起こす。これは、ネガティブコントロール(cDNAテンプレートなし)のサンプルからもシグナルが検出されることによって確認される。テンプレートサンプルの生成において逆転写酵素を省略すると(即ち-RT反応)、cDNAテンプレートが生成されず、このサンプルからのシグナルは、gDNA汚染物質由来のものである。「+RT」サンプルからのシグナルは、cDNA又は汚染物質であるgDNAのいずれかに起因して生成したものである。したがって、汚染物質であるgDNAが生成したシグナルを定量化するためには、「-RT」サンプルが重要である。

#### 【0055】

図5～図7は、ABI7000と関連ソフトウェアを用いて、種々の脾臓RNAから得られた定量的PCRの生産量を示している。本発明のカラム及び方法により単離されたRNAと、QIAGEN RNeasy Mini Kitを用いて単離されたRNAの結果を図5に示す。本発明のカラム及び方法を用いて単離したRNAからの反応のバックグラウンドは、QIAGEN法で単離したRNAからの反応のバックグラウンドより大幅に低かった。QIAGENサンプルのバックグラウンドは、製造業者の指示に従ってオンカラムDNase消化を用いることで、本法のサンプルのレベルにまで低減させることができる。この結果を図6に示している。本法のRNAからのバックグラウンドは、オンカラムDNase消化によってさらに低減させることができる(図7参照)。

#### 【0056】

RNA単離のメカニズムは、沈殿を介する。精製されたRNA、ある程度精製された(予備濾過後)状態のRNA、又は複雑な生体サンプル内のRNAは、グアニジンとエタノールの存在下で沈殿する。その沈殿物を、例えば遠心分離することで収集することができる。本発明のRNA単離膜カラムを用いることで、RNA沈殿物の収集、収集された沈殿物の洗浄(洗浄容積と遠心分離時間が低減される)、ターゲット核酸の再懸濁及び溶出が容易になる。

#### 【0057】

膜材料は沈殿物に対する物理的障壁として機能する受動的な役割しか果たさないが、沈殿物を効率的に収集し、吸収による損失を低減させるために、ポリマー材料の性質が重要となる。例えば、種々の細孔径を有する膜を比較すると、RNA回収量の変化に帰着する。同様に、種々のポリマー成分で製造された膜を比較した場合にも、RNA回収量は変化する。

#### 【0058】

膜の細孔径と回収RNA重量の変化との関係を示すために、マウスの脾臓をホモジナイズして、ガラスファイバー予備濾過カラムに通過させた。この予備濾過されたホモジネートのアリコート250 $\mu$ L(12.5mg)を、70%エタノール250 $\mu$ Lと混合し、以下に示す種類の異なる4つのスピニングカラムに導入した。(i)0.8 $\mu$ mMMM(ポリスルホンとPVP(ポリ(ビニルピロリドン))の混合物)、(ii)0.8 $\mu$ mBTS(ヒドロキシプロピルセルロース処理したポリスルホン)、(iii)0.1 $\mu$ mMMM、(iv)0.1 $\mu$ mBTS。これらのスピニングカラムを洗浄し乾燥させた後、50 $\mu$ Lを用いて各カラムからトータルRNAを溶出させた。溶出液内のRNAの回収量を、Agilent model 8453 UV/Vis分光光度計を用いて、260nmにおける吸光度を測定することで定量化した。図8は、O.D.260の測定値から導出したトータルRNA収率を示すグラフである。図8の最初の2つのカラム(以下の表10にもデータを示している)を比較すると、回収RNAの質量に関して、MMM膜はBTS膜に比べて際立った利点を有することを示している。これらの膜は、各々異なるポリマー材料で構成されている。カラム2、3、4(0.8BTS、0.2BTS及び0.1BTS)の結果から、最適な性能を実現するためには、膜の細孔径も最適化しなければならないことが分かった。

#### 【0059】

キットもまた、本発明の1つの実施形態である。本発明のキットには、少なくとも1つ

10

20

30

40

50

の予備濾過カラムが含まれる。一態様では、予備濾過カラムは、ガラスファイバー又はホウケイ酸ファイバーなどのファイバー材から構成される。キットにはまた、少なくとも1つのRNA単離カラムも含まれる。このRNA単離カラム内の膜として、限定はしないが、BTS、PVDF、ナイロン、ニトロセルロース、ポリスルホン、MMM、PVP、及びこれらの混合物が挙げられる。試薬もまた、本実施形態のキットの一部である。当該試薬には、少なくとも1つの有機溶媒と少なくとも1つの溶解バッファーが含まれる（上述したものなど）。他の試薬もまた、キット内に含めることができる。本発明を実施するための実験者に対する説明書も含まれる。

#### 【実施例1】

#### 【0060】

#### 構成要素の作製

##### (a) シリコンカーバイドウィスカーカラムの作製

サーメット社（米国ニューヨーク州バッファロー）のシリコンカーバイドウィスカーを、水溶液中でスラリー化させた。スピнкаラム装置（オロケム社、米国イリノイ州ウェストモント）を真空マニホールド上に乗せ、細孔径が約7 $\mu$ mのポリエチレンフリット（ボレックス社、米国ジョージア州フェアバーン）をスピнкаラム内に配置した。次いで、SiCwスラリーをスピнкаラム内の前記フリット上に配置し、真空にした。カラムを真空でわずかに乾燥させた。プラスチック固定リングをシリコンカーバイドウィスカー層上に配置し、スピнкаラムを固定した。

#### 【0061】

##### (b) ファイバーフィルタカラムの作製

この特定の例では、ファイバーフィルタ材としてWhatman GF/F Glass Fiber Filter (cat番号1825-915)をフィッシャーサイエントフィック社（米国ジョージア州アトランタ）から購入した。（購入した大きなシート又はディスク状の）多数の層を、9132"ハンドパンチ（マクマスターカー社、米国イリノイ州シカゴ）を用いてパンチし、本発明の予備フィルタを形成し、それを、90 $\mu$ mのポリエチレンフリット（ボレックス社、米国ジョージア州フェアバーン）を備えるスピнкаラム（オロケム社、米国イリノイ州ウェストモント）内に配置した（その場合、ファイバーフィルタ材は、ポリエチレンフリット上に配置した）。フィルタ材上にしっかりと固定した固定リングを用いてファイバー材をカラムに固定し、ファイバー（オロケム社、イリノイ州ウェストモント）が過剰に膨らむのを防いだ。例として図2を参照されたい。

#### 【0062】

##### (c) 試薬の調製

以下の溶液を調製し、又は市販されているもの入手し、後述する実施例に記載される方法において使用した。調製した試薬は全て、スクエアゼリーのH<sub>2</sub>O内で調製し、溶解溶液、DNase I及びプロテイナーゼK以外は、室温で保存した。βメルカプトエタノールを含む溶解溶液は4℃で保存し、DNase I及びプロテイナーゼKは-20℃で保存した。

#### 【0063】

#### 溶解バッファー / 溶液ストック

4 M グアニジンチオシアネート（シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス）

25 mM トリス、pH 7（アンピオン社、米国テキサス州オースティン）

実際の溶液の調製では、βメルカプトエタノールを加えて143 mMの濃度にした。

#### 【0064】

#### 洗浄バッファー #1

約0.2 M ~ 約2 M、例えば1 M、のグアニジンチオシアネート（シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス）

pHが約6 ~ 約9、例えば7、の25 mM トリス（アンピオン社、米国テキサス州オースティン）

10

20

30

40

50



約 5 % ~ 約 25 %、例えば 10 %、のエタノール (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

【0065】

#### 洗浄バッファー # 2

pH が約 6 ~ 約 9、例えば 7、の 25 mM トリス (アンピオン社、米国テキサス州オースティン)

約 40 % ~ 90 %、例えば 70 %、のエタノール (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

【0066】

#### Q I A G E N (登録商標) 試薬

製造業者の指示に従って、RLT、RW1、RPE の各バッファーを調製した (RNeasy Mini Kit、部品番号 74104、米国カリフォルニア州バレンシア)。

【0067】

#### DNase I

RNase フリー DNase I は、フェルメンタス社 (米国メリーランド州ハノーバー) から入手した。

プロテインアーゼ K は、フェルメンタス社 (米国メリーランド州ハノーバー) から入手した。

【0068】

#### DNase バッファー 10 X

1 M トリス、pH 8 (アンピオン社、米国テキサス州オースティン)

100 mM 硫酸マグネシウム (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

100 mM 塩化カルシウム (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

1 mg / mL ウシ血清アルブミン (シグマ社、米国ミズーリ州セントルイス)

【0069】

#### 溶出バッファー

溶出バッファーの 3 つの例は、pH 6 ~ 9 の、10 mM の EDTA 及び 10 mM のクエン酸ナトリウム、並びにヌクレアーゼフリー水である。

【実施例 2】

【0070】

#### マウス組織からの RNA の単離

次に、マウスの種々の組織及び細胞から RNA を単離する実験に関して説明する。RNA は、SiCw カラム (図 1) を用いて単離した。RNA は、製造業者の指示に従って、Bioanalyzer 2100 (アジレントテクノロジーズ社、カリフォルニア州パロアルト、部品番号 G2938B) において、RNA 6000 Nano Assay (アジレントテクノロジーズ社、部品番号 5065-4476) を用いて、分析した。図 9 及び表 5 に、多数のアッセイから得られた結果を示している。即ち、図 9 に示している全てのアッセイが同一のチップ上で実施されたわけではない。図 9 記載の記号を説明すると、L はアンピオン社 RNA 6000 Ladder (部品番号 7152) の Ladder であり、レーン 1 ~ 2 は SiCw カラムにより単離した脳の RNA、レーン 3 ~ 4 は SiCw カラムにより単離した肝臓の RNA、レーン 5 ~ 6 は SiCw カラムにより単離した腎臓の RNA、レーン 7 ~ 8 は SiCw カラムにより単離した脾臓の RNA、レーン 9 ~ 10 は SiCw により単離した脾臓の RNA である。表 5 には、RNA 収率をまとめている。

【0071】

採取直後に液体窒素で急速冷凍したマウスの臓器は、ベルフリーズバイオロジカル社 (米国アーカンソー州ロジャーズ) から入手した。あるいはまた、マウスの臓器は、採取後すぐに用いることもできる、RNA Later (アンピオン社、米国テキサス州オースティン) 溶液中で保存することもできる。

【0072】

10

20

30

40

50

サンプルの重さを量り、約4～約8のpHを有する過剰な溶解溶液（出願者の方法、典型的には20倍過剰）中で、OMNI TH組織ホモジナイザ（オムニ社、米国バージニア州フレントン）を用いて15000rpmにて30秒間パワーホモジナイズを実施した。

#### 【0073】

細胞株は、American Type Tissue Collection (ATCC 米国バージニア州20108マナサス)から入手し、提供された指示に従って成長させた（表5を参照）。細胞をトリプシン処理（trypsinize）し、培養容器から分離し、再び懸濁させ、血球計算器を用いてカウントした。懸濁液を1000×gにて10分間遠心分離した。得られたペレットを溶解溶液内に再び懸濁させ、最終的な濃度を8.3×10<sup>6</sup>細胞/mLにして、1分にわたって強力に渦動混合した。あるいはまた、細胞を細胞培養容器内に溶解させることもできる。

10

#### 【0074】

組織又は細胞のホモジネート（典型的には300μL～600μL）を、スピнкаラム内のガラスファイバー予備フィルタに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機（ブリュンマンス社、米国ニューヨーク州ウエストベリー）内で16000×gにて3分間遠心分離した。

#### 【0075】

各組織ホモジネートに、等量の70%エタノールを加え混合した。シリコンカーバイドウィスカー（SiCw）15mgを含むスピнкаラムを、キャップのない2mLの収集管内に配置し、エタノール含有ホモジネートを当該スピнкаラムに加えた。スピнкаラムを16000×gにて少なくとも10秒間スピンさせた。フロースルー（カラムに吸着しなかった物質）を収集管からデカントし、スピнкаラムを収集管に戻した。

20

#### 【0076】

スピнкаラムを500μLの洗浄バッファー#1で洗浄し、16000×gにて少なくとも10秒間遠心分離した。遠心分離後、スピнкаラムに対してDNase消化を実施することができる。DNase消化を実施しない場合は、さらに洗浄バッファー#2を、それぞれの回で500μL及び250μL加えて、16000×gにて少なくとも10秒間2回遠心分離する。次いで、スピнкаラムを16000×gにて2分間遠心分離し、最後の少量の洗浄バッファー#2を除去した。スピнкаラムを2mLの収集管から取り出して、1.5mLのヌクレアーゼフリーマイクロ遠心分離管内に配置した。

30

#### 【0077】

ヌクレアーゼフリー水50μLでRNAを2回溶出させ、それぞれ、15秒間及び2分間遠心分離した。次いで、RNAを-20℃又は-70℃で保存することができる。

#### 【0078】

260nm及び280nmにおける吸光度を、アジレントテクノロジー社の8453 UV/VIS分光光度計を用いて測定し、溶出したRNAの存在を確認した。

#### 【0079】

本実験で得たRNAを、RNA 6000 Nano Assay（アジレントテクノロジー社、米国カリフォルニア州バロアルト）を用いて、製造業者の指示に従って、アッセイを実施した。ソフトウェアにより生成された画像を図9に示している。

40

#### 【0080】

表5及び図9から見てとれるように、本発明による方法及び装置を用いて精製したRNAは、高い収率、純度、完全性を有する。

#### 【0081】

表5：SiCwカラムを用いた場合のRNA収率（実施例2及び3参照）

【表 5】

培養細胞及びマウス組織からの t c RNA の単離

	$\mu\text{g-tcRNA}/10^6$ 個細胞 又は mg-組織	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$
HEK 293	24	2.0
HeLa S3	7.3	1.9
NIH 3T3	14.8	2.3
脳	0.6	1.8
肝臓	3.0	2.0
腎臓	2.2	2.1
脾臓	12.3	2.0
脾臓	4.7	2.1

10

## 【実施例 3】

## 【0082】

以下の実験では、種々の種類のガラスファイバーフィルタ材を用いて、RNA 単離を実施した。以下、それを並べて示す。

## 【0083】

予備濾過装置及びそれに関連する方法に関しては、種々の種類の 16 層からなるガラスファイバーフィルタを構成した。Whatman Types GF/F (カタログ番号 1825-915) 及び GF/D (部品番号 1823-150) は、フィッシャーサイエンス (米国ジョージア州アトランタ) から入手した。Pall Life Sciences Types A/B (部品番号 66211) 及び Types A/D (部品番号 66227) は、VWR 社 (米国ペンシルベニア州ピッツバーグ) から入手した。DNase 消化を実施するサンプルに関しては、後に概説するオンカラム DNase 消化法を用いた。

20

## 【0084】

以下のサンプルの精製は、製造業者の指示に従って QIAGEN (登録商標) シリカベースの方法によって、又は、本発明のシリコンカーバイドウィスカー法と装置を用いて実施した。さらに、オンカラム DNase 消化法を用いた。得られた RNA は、アジレントテクノロジーズ社の Bioanalyzer 2100 (アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州パロアルト、部品番号 G2938B) を用いて、同社の RNA 6000 Nano Assay (部品番号 5065-4476) により、製造業者の指示に従って、アッセイした。図 3 は、ソフトウェアにより生成された電気泳動アッセイの結果を示している。

30

## 【0085】

採取後すぐに液体窒素で急速凍結したマウスの脾臓を、ベルフリーズバイオロジカル社 (米国アーカンソー州ロジャーズ) から入手した。脾臓には大量の gDNA が存在するため、脾臓組織は、RNA を単離するのもっとも困難な組織の一つである。そのため、本明細書で示す実施例では、脾臓組織を採用した。予備濾過後、シリコンカーバイドウィスカー (SiCw) 及び / 又はシリカベース (QIAGEN) 単離法を用いて、脾臓 RNA を単離した。

40

## 【0086】

サンプルの重さを量り、約 4 ~ 約 8 の pH を有する過剰の溶解バッファー (上記のもの) 又はキアゲン社の RLT (典型的には 20 倍過剰) 中で、OMNI TH 組織ホモジナイザ (オムニ社、米国バージニア州ワレントン) を用いて、30 秒間 15000 rpm にてパワーホモジナイズした。

## 【0087】

組織ホモジェネート (典型的には約 300  $\mu\text{L}$  ~ 600  $\mu\text{L}$ ) は、16000  $\times$  g にて 3 分間遠心分離することにより前処理して、QIAGEN カラムに使用した。又は、本発明のガラスファイバー予備フィルタに加え、次いで Eppendorf 5415D マイクロ遠心分離機 (プリングマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー) を用いて 160

50

0.0 × g にて 3 分間遠心分離することにより前処理して、SiCw カラムに使用した。

【0088】

各組織ホモジネートに、等量の 70 % エタノールを加え混合した。次いで、エタノール含有ホモジネートを、キアゲン社の RNeasy Mini Kit (米国カリフォルニア州バレンシア、部品番号 74104) からのミニスピンカラムか、又は本明細書で説明した SiCw に加えた。

【0089】

次いで、スピンカラムを 16000 × g にて少なくとも 10 秒間遠心分離した。各々から得られた流出物を収集し、2 mL の収集管からデカントし、スピンカラムを収集管の中に戻した。

【0090】

次いで、スピンカラムを 700 μL の RW1 (キアゲン社 RNeasy カラム) 又は 700 μL の洗浄バッファー #1 で洗浄し、16000 × g にて少なくとも 10 秒間遠心分離した。SiCw スピンカラムを使用したサンプルに関しては、SiCw スピンカラム内容物に対して、以下に説明するように、DNase 消化を実施するか、又は洗浄バッファー #2 による洗浄を実施した。

【0091】

DNase 消化を実施しないカラムに関しては、上記のように、500 μL (一回目) 及び 250 μL (二回目) の RPE (キアゲン社 RNeasy カラムバッファー) 又は洗浄バッファー #2 を加えて、カラムを、上記のように 2 回遠心分離した (少なくとも 10 秒間、16000 × g)。2 回目の遠心分離を 16000 × g にて 2 分間へと延長し、最終的に微量の RPE 又は洗浄バッファー #2 を除去した。各カラムを、2 mL の収集管から取り出し、1.5 mL のヌクレアーゼフリーマイクロ遠心分離管内に配置した。500 μL のヌクレアーゼフリー H<sub>2</sub>O を用いて、RNA を 2 回溶出させた。次いで、RNA を -70 °C で保存した。

【0092】

上記のように、例えば、洗浄バッファー #2 を加える前に、サンプルを任意に DNase 処理することができる。DNase 処理を実施するカラムに関しては、DNase I を、最終的には 100 μL の容積になるように、1 × DNase バッファー中で 0.5 μg / μL の濃度にまで希釈し、SiCw のカラムに加えた。(本明細書に記載する本発明の方法においては、DNase バッファーとして、例えば 100 mM 程度の低濃度の塩を使用しているが、殆どの従来の方法では高濃度の塩を必要とすることに注意されたい。例えば、オンカラム消化用の一部の市販の DNase バッファーには、1 M の塩化ナトリウムが使用されている)。DNase は、高濃度のイオンに非常に敏感であるため、本発明の方法では、イオン強度を強めたり、結合を保持したりする塩を使用しない (上記実施例 1 において列挙されている試薬を参照されたい)。例えば、本実施例では、10 mM の塩化カルシウムしか使用しない。次いで、25 °C にて 15 分間カラムを培養した。洗浄バッファー #1 を 500 μL 加え、16000 × g にて少なくとも 10 秒間遠心分離して消化を終了させた。次いで、洗浄バッファー #2 で洗浄し、最終的に微量の洗浄バッファー #2 を除去した後に、上記のように溶出を実施した。QIAGEN 法を利用するサンプルに関しては、DNase 消化は実施しなかった。

【0093】

Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ社、米国カリフォルニア州フォスターシティ) を用いて、5' ヌクレアーゼアッセイ又は「リアルタイム」PCR アッセイ実施して、ゲノミック DNA の汚染物質を定量化した。この種のアッセイでは、各 PCR サイクルで蓄積される PCR 生成物の量がモニタリングされる。これは、PCR 生成物を検出するための、非常に高感度で再現性の高いアッセイである。

【0094】

マウス脾臓から単離した tcrRNA (~20 ng) を、マウスに特異的なプライマとブ

10

20

30

40

50

ローブを含有する反応混合物 ( Genbank Accession NM\_008084 ) グリセラルデヒド-3-フォスフェート デヒドロゲナーゼ ( glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH ) に加えた。全てのサンプルを、500nMの両プライマ、200nMの蛍光プローブ、及び1X Taqman Universal Master Mix ( 部品番号43044437 ) から構成される反応混合物内で、当分野で周知の条件下で実施した。マウスのゲノミックDNA ( プロメガ社、米国ワイオミング州マディソン ) を倍々希釈して、標準曲線を作った。全てのサンプル、標準サンプル、非鋳型対照サンプルに関して、2回実施した。

#### 【0095】

マウスのGAPDHアッセイにより、エクソン内で78塩基対のフラグメントが増幅された。GAPDHアッセイのプライマとプローブは、プライマ発現ソフトウェアパッケージ ( アプライドバイオシステム社、米国カリフォルニア州フォスターシティ、部品番号4329442 ) において使用されるように設計されている。プライマは脱塩され、また、プローブ ( 5' が6-FAMにより、3' がBHQ-1により標識化されている ) は、陰イオン交換、それに次ぐ逆位相HPLC ( バイオサーチテクノロジー社、米国カリフォルニア州ナバト ) により、精製された。

#### 【0096】

両アッセイに関するアッセイサイクリングパラメータ ( assay cycling parameter ) は、製造業者によって設定されたデフォルト条件 ( 即ち、50℃にて2分間、95℃にて10分間、次いで95℃にて15秒間と60℃にて1分間を40サイクル ) であった。単離されたtcrAN中のgDNAの定量は、マウスのgDNA標準曲線から計算し実施した。

#### 【0097】

表6は、遠心分離、予備濾過、DNase消化、QIAGEN法、本発明のSiCw法などを種々に組み合わせて、予備濾過及び/又はオンカラムDNase消化を施した際の、gDNAの低減を示す、定量的PCRアッセイの結果である。表2は、図3に示す脾臓tcrNA実験に関するRNA収率及びgDNA汚染を示すものである。gDNA汚染が高いサンプルについては収率を示していない。gDNAの量は、上記実施例で説明したリアルタイムPCRアッセイにより決定した。

#### 【0098】

図10は、Agilent RNA6000 Nano Assayで検出されたgDNA汚染物質濃度を示している。gDNA濃度は、レーン1~3、10~12、16~18、19~21では高レベルであるが、例えばレーン4~6では低レベルである。図4の凡例は、以下の通りである。Lは、Ambion RNA6000 Ladder ( 部品番号7152 ) のラダー、レーン1~3は、精製した ( 遠心分離した ) ホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン4~6は、GF/Fで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン7~9は、GF/Fで予備濾過したホモジネートをオンカラムDNase消化処理しSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン10~12は、GF/Dで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン13~15は、A/Bで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン16~18は、A/Dで予備濾過したホモジネートをSiCwカラムで単離した脾臓RNA、レーン19~21は、精製した ( 遠心分離 ) ホモジネートをRNeasy minicolumnで単離した脾臓RNA、レーン22~24は、GF/Fで予備濾過しRNeasy columnで単離した脾臓RNAである。

#### 【0099】

このアッセイによって、特定の種類のファイバーとフィルタだけが、総gDNA汚染物を効果的に除去できることが実証された。例えば、レーン4、5及び6からわかるように、Whatman GF/Fフィルタ材を使用することが効果的であった。この場合、最終的な溶出サンプルには、gDNA汚染物質はほとんど含まれておらず、DNase消化

10

20

30

40

50

は実施しなかった。同様に、本発明のガラスファイバーフィルタを使用した予備濾過法によって Q I A G E N 法を補足したレーン 22 ~ 24 では、Q I A G E N 法を使用した他の全サンプル / レーンと比較して、存在する g D N A 汚染物がはるかに少なかった。

#### 【0100】

対照的に、レーン 10 ~ 12 及び 16 ~ 18 では、かなり多くの g D N A が存在した。レーン 10 ~ 12 では、約 3  $\mu$  m の粒子を保持する能力を有するフィルタ材を使用し、また、レーン 16 ~ 18 では、約 1  $\mu$  m の粒子を保持する能力を有するフィルタ材を使用した。一方、レーン 4 ~ 6 及び 22 ~ 24 で使用したフィルタ材は約 0.7  $\mu$  m の粒子を保持する能力を有するものであった。従って、フィルタの種類、組成、性能を最適化する必要がある。

#### 【0101】

表 6 及び図 10 を参照すると、D N a s e 消化を実施しないレーン 1 ~ 3、10 ~ 12、16 ~ 18、19 ~ 21 では、R N A 定量化が本質的に無意味になるほど多くの g D N A 汚染物質の存在することが観察された。しかしながら、レーン 4 ~ 6 及び 22 ~ 24 の結果から、本発明の予備濾過法及び装置は、本質的に無視できる量の g D N A 汚染に帰着することが確認された。実際、予備濾過では、D N a s e 処理を実施しなくても、D N a s e 処理後に残存する g D N A とほとんど同程度の g D N A が残さず、D N a s e 処理とほぼ同じ R N A 収率が得られる。本発明の予備濾過法と装置を使用したレーン 4 ~ 6 の R N A 収率及び g D N A 量と、従来の D N a s e 処理と予備濾過法を組み合わせることで、全ての g D N A を実質的に除去することができ、実験者は、特定の用途において望まれる場合には、D N a s e 処理を回避することができ、

#### 【0102】

Q I A G E N 法に関しては、これらの方法で使用する D N a s e 消化はプロメガ社によって説明されており、そのプロトコルは Q I A G E N キットに採用されている。しかしながら、D N a s e 消化の使用は、常に、最終用途に依存する。例えば、Q I A G E N キットを使用しても、ノーザンハイブリダイゼーションでは D N a s e 消化はおそらく必要であろう。従って、D N a s e 消化を使用するかしないか、また必要であるか否かは、R N A を単離する最終用途に依存する。

#### 【0103】

本発明の方法及び装置によって、R N A を単離する元のサンプルから効果的に g D N A を除去し、D N a s e 消化を不必要にし（しかし必要な場合は D N a s e 消化と両立できる）、特にシリカベースのキットである市販の R N A 単離キット（例えばキアゲン社の R N e a s y k i t）と共に機能し、それらの効果を高めることが確認された。

#### 【0104】

表 6 : 図 9 に示す単離 t c R N A に関する、R N A 収率及び g D N A 汚染量

【表 6】

予備濾過された脾臓RNA単離体に関するgDNAの低減

	図10中のレーン	$\mu\text{g-tcRNA/mg-組織}$	$\text{pg-gDNA/ng-tcRNA}$
遠心分離後 SiCw 単離	1-3	NA	344
GF/F 予備濾過後 SiCw 単離	4-6	4.7	3.48
GF/F 予備濾過及び DNase 処理後 SiCw 単離	7-9	4.9	0.12
GF/D 予備濾過後 SiCw 単離	10-12	NA	218.2
A/B 予備濾過後 SiCw 単離	13-15	3.3	87.83
A/D 予備濾過後 SiCw 単離	16-18	NA	302
遠心分離後 QIAGEN 法単離	19-21	NA	190
GF/F 予備濾過後 QIAGEN 法単離	22-24	4.5	1.42

10

## 【実施例 4】

【0105】

20

## マウス肝臓ホモジェネート

マウス肝臓ホモジェネートを上記のように調合し、RNA単離に用いた。実施例2で示した、濾過したホモジェネートに70%エタノールを加える手順の代わりに、等量のRNAseフリー水、70%イソプロパノール又はメタノールを加えた。この混合液をSiCwスピンカラムに加え、次いで、上記のようなRNA単離を実施した。

【0106】

260nm及び280nmにおける吸光度を、Agilent Technologies 8453 UV/VIS分光光度計で測定し、溶出したRNAの存在を確認した。

【0107】

この結果を表3に示している。

30

【0108】

表7: RNA収率

【表 7】

有機溶媒の添加による肝臓RNA収率の向上

	$\mu\text{g/mg-組織}$	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$
ホモジェネート	0.2	2.0
ホモジェネート + 水	0.4	2.0
ホモジェネート + エタノール	3.1	2.0
ホモジェネート + イソプロパノール	3.6	2.0
ホモジェネート + メタノール	3.2	2.0

40

## 【実施例 5】

【0109】

## 植物組織からのRNA単離

シロイヌナズナの葉の重さを量り、OMNITH組織ホモジナイザ(オムニ社、米国バージニア州ワレントン)を用いて、過剰の溶解バッファー内で15000rpmにて30秒間パワーホモジナイズした。採取後に葉の組織を冷凍し、上記のようにホモジナイズすることもできる。

【0110】

組織ホモジェネート(典型的には約300 $\mu\text{L}$ ~600 $\mu\text{L}$ )を、16000 $\times\text{g}$ にて

50

2分間遠心分離することにより前処理した。又は、本発明のガラスファイバー予備フィルタに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機（プリंकマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー）を用いて、16000×gにて2分間遠心分離することにより前処理した。

【0111】

各組織ホモジェネートに、等量の70%エタノール（結合促進剤の一例）を加え混合した。次いで、スピncラムを16000×gにて少なくとも10秒間遠心分離した。各サンプルからの流出物を収集し、それぞれ2mLの収集管からデカントし、スピncラムを収集管に戻した。

【0112】

次いで、500μLの洗浄バッファー#1を用いてスピncラムを洗浄し、16000×gにて少なくとも10秒間遠心分離した。次いで、上記のように各ラムに、1回目は500μL、2回目は250μLの洗浄バッファー#2を加えて、16000×gにて少なくとも10秒間2回遠心分離した。2回目の遠心分離を16000×gにて2分間に延長して、最終的に微量の洗浄バッファー#2を除去した。次いで、各ラムを2mLの収集管から取り出し、1.5mLのマイクロ遠心分離管内に配置した。次いで、500μLのスクレーパーH<sub>2</sub>Oを用いて、RNAを2回溶出させた。次いで、RNAを-20℃又は-70℃で保存した。

【0113】

植物組織のRNA単離の結果を図11に示す。得られたRNAについて、Bioanalyzer 2100（アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州パロアルト、部品番号G2938B）において同社のRNA 6000 Nano Assay（部品番号5065-4476）を用いて、製造業者の指示に従ってアッセイを実施した。図5は、コンピュータで生成した、電気泳動アッセイ結果のプリントアウトである。図5の凡例は、以下の通りである。Lは、Ambion RNA6000 Ladder（部品番号7152）のラダー、レーン1～3は、GF/Fで予備濾過したホモジェネートをSiCwラムで単離したシロイヌナズナのRNA、レーン4～6は、精製した（遠心分離した）ホモジェネートをSiCwラムで単離したシロイヌナズナのRNAである。

【0114】

図9及び表7に示す動物組織と同様に、レーン1～3に示す結果から、本発明の予備濾過方法及装置を使用することで、植物組織サンプルからもほとんどのgDNAを除去し得ることが理解されよう。実際、予備濾過後に存在するgDNA濃度は、高感度アッセイを使用しても検出できなかった。

【0115】

ゲノミックDNA汚染物質は、Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System（アプライドバイオシステムズ社、米国カリフォルニア州フォスターシティ）において、5'スクレーパーアッセイ、又は「リアルタイム」PCRアッセイにより定量化した。この種のアッセイでは、PCRサイクル毎に蓄積するPCR生成物の量がモニタリングされる。これはPCR生成物を検出するための、非常に高感度で再現性の高いアッセイである。

【0116】

シロイヌナズナの葉から単離したtcRNA（200ng）を、18SリボソームRNAに対して特異的なプライマ及びプローブを含む反応混合物に添加した。製造業者の基準によれば、全サンプルを、500nMの両プライマ、200nMの蛍光プローブ、1×Taqman Universal Master Mix（部品番号43044437）から構成される反応混合液内で実施した。シロイヌナズナの葉から精製したDNAをプロメガ社のキットを用いて倍々希釈して標準曲線を作った。全サンプル、標準サンプル、非特異対照サンプルについて2回実施した。

【0117】

このアッセイによって、エクソン内で187塩基対のフラグメントが増幅される。プラ

10

20

30

40

50



イマ及びブローブは、プライマ発現ソフトウェアパッケージ（アプライドバイオシステムズ社、米国カリフォルニア州フォスターシティ、部品番号4329442）を使用して設計した。プライマは脱塩され、また、ブローブ（5'が6-FAMにより、3'がBHQ-1により標識化されている）は、陰イオン交換、及びそれに次ぐ逆位相HPLC（バイオサーチテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州ナバト）により精製した。両アッセイのアッセイサイクリングパラメータは、製造業者が設定したデフォルト条件であった。即ち、50℃にて2分間、95℃にて10分間、次いで95℃にて15秒間から60℃にて1分間を40サイクル実施した。

【0118】

単離したtcRNA中のgDNAの定量は、シロイヌナズナgDNA標準曲線から計算して実施した。この結果を表8に示す。図11及び表8に示す結果によって、本発明のガラスファイバー予備濾過法と装置が、植物組織においても使用できる汎用性を有することを示している。

【0119】

表8：図11に示す単離RNAに関する、RNA収率及びgDNA汚染量

【表8】

予備濾過したシロイヌナズナRNA単離体に関するgDNAの低減

	図11中のレーン	$\mu\text{g-tcRNA/mg-組織}$	$\text{pg-gDNA/ng-tcRNA}$
予備濾過後	1-3	0.18	ND*
SiCw単離			
精製（遠心分離）後	4-6	0.13	52.4
SiCw単離			

ND\*：検出されず

【実施例6】

【0120】

他の組織の単離

上記の単離精製法に加え、皮膚、心臓及び筋肉のような、結合組織及び構造タンパク質の多い組織からのRNAの単離もまた、プロテイナーゼK処理により容易になる。この場合、まず始めに、そのような組織を上記のようにホモジナイズし、等量の水をサンプルに加える。次いで、プロテイナーゼKを加えて、最終的な濃度を1ユニット/100 $\mu\text{L}$ にし、混合し、55℃にて10分間培養することができる。次いで、本発明の予備フィルタカラムを用いてホモジェネートを遠心分離することができる（さらなる処理を実施してもなくてもよい）。この場合、上記のDNase処理を実施してもよいし実施しなくてもよい。

【0121】

また、固相抽出（SPE）カラム及び真空ポンプと共に使用するよう設計されている真空マニホールドを用いて、多くのサンプルからのRNA調製を容易にすることができ。サンプルは上記のようにホモジナイズし、精製し、エタノールなどの低分子量アルコールと混合する。本発明のSiCwカラムを使用する場合には、SiCwスピニングカラムを真空マニホールドに乗せ、コックを閉じた位置にする。次いで、エタノールを含むホモジェネートをカラムに加え、コックを開いてホモジェネートを流すことができる。次いで、コックを閉じて、洗浄バッファー#1を500 $\mu\text{L}$ に加え、再びコックを開く。先述のように、500 $\mu\text{L}$ 及び250 $\mu\text{L}$ の洗浄バッファー#2を用いて、このプロセスを繰り返す。次いで、コックを2分間開いたままにしてスピニングカラムを乾燥させ、次にスピニングカラムを1.5mLマイク口遠心分離管内に配置して、先述の最終溶出を実施する。

【実施例7】

【0122】

RNA単離カラムにおいて使用する構成要素の準備

単離カラムの製造

単一層からなる膜（例えば0.8 $\mu\text{m}$ BTS）を、ミニスピニングカラム装置（オロケム社

10

20

30

40

50

、米国イリノイ州ウェストモント)内の約90 $\mu$ mの細孔径を有するポリエチレンフリット(ボレックス社、米国ジョージア州フェアバーン)上に配置した。プラスチックの固定リングを当該アセンブリに乗せ、固定した(図3)。

【0123】

#### ファイバー予備濾過カラムの製造

予備濾過カラムは、米国特許出願第10/631、189号に記載の通り製造した。参照することで、その内容の全てを本明細書に取り入れることとする。これは、実施例1に概略した手順と同じである。

【0124】

#### 試薬の調合

実施例1cと同様に試薬を調製した。

【実施例8】

【0125】

#### マウス組織からのRNAの単離

オンカラムDNase消化と共に、又はオンカラムDNase消化を行うことなく、膜単離カラムを用いて、マウスの種々の組織及び細胞からRNAを単離した。RNAは、製造業者の指示(参照することでその内容の全てを本明細書に取り入れることとする)に従って、Bioanalyzer 2100(アジレントテクノロジーズ社、米国カリフォルニア州パロアルト、部品番号G2938B)において、RNA 6000 Nano Assay(同社、部品番号5065-4476)を用いてアッセイを実施した。

【0126】

採取後すぐに液体窒素で急速凍結したマウスの臓器は、ベルフリーズバイオロジカルズ社(米国アーカンサス州ロジャース)から入手した。あるいはまた、マウスの臓器は採取後すぐに使用することもできるし、RNA Later(アンピオン社、米国テキサス州オースティン)の溶液内にて保存することもできる。

【0127】

サンプルの重さを量り、OMNI TH組織ホモジナイザ(オムニ社、米国バージニア州ワレントン)を用いて、15000rpmにて30秒間、過剰な溶解溶液(典型的には20倍過剰)中でパワーホモジナイズした。

【0128】

細胞株は、American Type Tissue Collection(ATCC 米国バージニア州20108マナサス)から入手し、提供された指示に従って成長させた。細胞をトリプシン処理(trypsinize)し、培養容器から分離し、再び懸濁させ、血球計算器を用いてカウントした。懸濁液を1000 $\times$ gにて10分間遠心分離した。得られたペレットを溶解溶液内に再び懸濁させ、最終的な濃度を8.3 $\times 10^5$ 細胞/mLにして、1分にわたって強力に渦動混合した。あるいはまた、細胞を細胞培養容器内に溶解させることもできる。

【0129】

組織又は細胞のホモジネート(典型的には300 $\mu$ L~600 $\mu$ L)を、スピンカラム内のガラスファイバー予備フィルタに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機(ブリンクマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー)内で16000 $\times$ gにて3分間遠心分離した。

【0130】

各組織ホモジネートに、等量の70%エタノールを加え、混合した。このエタノール含有ホモジネートを、実施例7で説明したとおりに組み立てた、細孔径が0.8 $\mu$ mの単一層からなるMMM膜(ボールライフサイエンス社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)を備える単離スピンカラムに加えた。次いで、そのスピンカラムを16000 $\times$ gにて少なくとも10秒間スピンさせた。フロースルーを収集管からデカントし、スピンカラムを収集管に戻した。

【0131】

10

20

30

40

50

次いで、500  $\mu$ L の洗浄バッファー #2 (上記のもの) を用いてスピンカラムを2回洗浄し、16000  $\times$  g に少なくとも10秒間遠心分離した。次いで、スピンカラムを、16000  $\times$  g にて2分間遠心分離し、微量の洗浄溶液を除去した。

【0132】

RNA をスクレアーゼフリー水 25  $\mu$ L を用いて溶出させ、16000  $\times$  g にて1分間遠心分離した。次いで、RNA を -70  $^{\circ}$ C で保存した。

【0133】

アジレントテクノロジー社の 8453 UV/VIS 分光光度計を用いて、260 nm 及び 280 nm における吸光度を測定し、溶出した RNA の存在を確認した。表 9 はこの結果得られた RNA 収率の一覧である。図 12 は、RNA 6000 Nano Assay ソフトウェアで生成した画像である。

【0134】

【表 9】

組織	$A_{260nm}$ により定量された 収率
脳 (30mg)	0.8 $\mu$ g/mg
肝臓 (30mg)	4.5 $\mu$ g/mg
腎臓 (30mg)	2.7 $\mu$ g/mg
脾臓 (10mg)	15 $\mu$ g/mg
膵臓 (15mg)	4.3 $\mu$ g/mg
HeLa 細胞 (5x10 <sup>6</sup> 個)	15.5 $\mu$ g/mg
NIH3T3 細胞 (5x10 <sup>6</sup> 個)	15 $\mu$ g/mg

【0135】

表 9 及び図 12 から分かるように、本発明の方法及び装置を使用して精製した RNA は、高い収率、純度、完全性を有する。図 12 では、レーン 1 は、分子量決定用のラダーであり、1 は脳、2 は腎臓、3 は肝臓、4 は脾臓、5 は膵臓、6 はヒラー細胞、7 は NIH3T3 である。

【実施例 9】

【0136】

#### 膜の最適化

種々のポリマー膜を有する単離スピンカラムを用いて、採取した後すぐに液体窒素で急速冷凍したマウスの脾臓と胸腺 (ヘルフリーズバイオロジカル社 (米国アーカンサス州ロジャース) から入手) から RNA を単離した。使用した膜は、0.1  $\mu$ m、0.2  $\mu$ m、0.8  $\mu$ m の BTS (ボールライフサイエンス社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)、0.8  $\mu$ m の MMM (ボールライフサイエンス社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)、0.45  $\mu$ m 及び 0.8  $\mu$ m の PVD F (ミリポア社、米国マサチューセッツ州ベッドフォード、親水性フッ化ビニリデン樹脂) である。RNA は、実施例 8 において説明したのと同様に単離したが、この実施例では、単離ステップのスピンカラムに使用する膜の種類を変えている。詳細な収率 ( $\mu$ g-tcRNA/mg-脾臓) を、表 10 に示している。

【0137】

表 10: 収率

10

20

30

40

【表 10】

	$\mu\text{g}-\text{tcRNA}/\text{mg-脾臓}$
0.1 $\mu\text{m}$ BTS	2.6
0.2 $\mu\text{m}$ BTS	4.2
0.8 $\mu\text{m}$ BTS	5.0
0.45 $\mu\text{m}$ PVDF	1.6
0.8 $\mu\text{m}$ PVDF	1.8
0.8 $\mu\text{m}$ MMM	5.5

## 【実施例 10】

## 【0138】

## ゲノミックDNA汚染の比較

採取後すぐに液体窒素で急速冷凍したマウスの脾臓、脾臓、胸腺は、ヘルフリーズバイオロジカルズ社（米国アーカンサス州リジャース）から入手した。脾臓と胸腺の組織にはgDNAが大量に存在するため、これらの組織からRNAを単離するのは困難なため、本明細書に示す実施例では脾臓と胸腺の組織を選択している。実施例9に説明したのと同様に、RNAをこれらの組織から単離した。

## 【0139】

DNase「陽性」と示したサンプルについては、サンプルの重さを量り、OMNIT H組織ホモジナイザ（オムニ社、米国バージニア州フレントン）を用いて、15000rpmにて30秒間、過剰な溶解溶液（典型的には20倍過剰）中でパワーホモジナイズした。組織のホモジネート（典型的には300 $\mu\text{L}$ ~600 $\mu\text{L}$ ）を予備濾過カラムに加え、Eppendorf 5415Dマイクロ遠心分離機（プリンクマン社、米国ニューヨーク州ウェストベリー）内で、16000 $\times g$ にて3分間遠心分離した。

## 【0140】

次いで、350 $\mu\text{L}$ の洗浄バッファース#2を用いてスピニングカラムを洗浄し、16000 $\times g$ にて2分間遠心分離して、微量の洗浄溶液を除去した。

## 【0141】

DNase（5ユニット）を、ピペットで24 $\mu\text{L}$ のDNase消化バッファースに加え、穏やかに混合した。この混合液を、ある程度精製したRNAを含むカラムの膜表面に加え、キャップを閉じて室温で15分間培養した。

## 【0142】

次いで、350 $\mu\text{L}$ の洗浄溶液#1を用いてスピニングカラムを1回洗浄し、16000 $\times g$ にて少なくとも10秒間遠心分離した。次いで、スピニングカラムを500 $\mu\text{L}$ の洗浄溶液#2で2回洗浄し、16000 $\times g$ にて少なくとも10秒間遠心分離した。その後、スピニングカラムを16000 $\times g$ にて2分間遠心分離し、微量の洗浄溶液を除去した。

## 【0143】

25 $\mu\text{L}$ のヌクレアーゼフリー水を用いてRNAを溶出させ、16000 $\times g$ にて1分間遠心分離した。その後、RNAを-70℃で保存した。

## 【0144】

比較のために、上記のようにマウスの脾臓をホモジナイズし、製造業者の指示に従って、QIAGEN RNeasy Mini Columnを用いての単離も行った。次いで、QIAGEN RNaseフリーDNaseセットを用いて、製造業者の指示に従って、サンプルをDNase消化した。

## 【0145】

ゲノミックDNA汚染物質は、実施例3に説明したのと同様に定量した。

## 【0146】

表1及び表2に戻ると、表1は、3つの組織に関する各条件下でのRNA収率を示しており、表2は、各々の中に含まれるgDNA汚染物質の濃度を示している。本発明の標準（-DNase）RNAに含まれるgDNAの濃度が低減していること、並びにオンカラ

10

20

30

40

50

△DNaseプロトコルを用いた場合にはさらに低減することが確認された。

【0147】

予備濾過とDNase消化を組み合わせて用いると、除去されるgDNAはやや増えるが、本発明の方法及び装置だけでも実質的に全てのgDNAを除去することができ、実験者は特定の用途において必要とされる場合には、DNase処理を避けることができる。

【0148】

従って、本発明による方法及び装置を用いることで、RNAが単離される元のサンプルからgDNAを効果的に除去し、DNase消化を不必要とし得る（しかし必要であればDNase消化と両立できる）ことが確認された。

【実施例11】

10

【0149】

#### 他の組織の単離

上記の単離精製法に加え、皮膚、心臓及び筋肉のような、結合組織及び構造タンパク質の多い組織からもまた、プロテイナーゼK処理によって容易にRNAを単離できる。

【0150】

まず始めに、そのような組織を上記のようにホモジナイズし、等量の水をサンプルに加える。次いで、プロテイナーゼKを加えて、最終的な濃度を1ユニット/100µLにし、混合し、55℃にて10分間培養することができる。次いで、本発明の予備フィルタカラムを用いてホモジエネートを遠心分離することができる（さらなる処理を実施してもよしなくてもよい）。この場合、上記のDNase処理を実施してもよいし実施しなくてもよい。

20

【0151】

特定の実施形態を参照して本発明を具体的に例示し、説明してきたが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細について種々の変更が可能であることが理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】本発明のSiCwカラムの概略図

【図2】本発明の予備フィルタカラムの概略図

【図3】RNA単離カラムの図

30

【図4】脾臓から単離されたRNAに関する、変性アガロースゲルを用いて得た結果

【図5】本発明の方法を用いて得た標準RNAとQiagen法により得たRNAを定量的RT-PCRにより比較したプロット図

【図6】本発明の方法を用いて得た標準RNAと、オンカラムDNase消化と共にQiagen法を用いて得たRNAを定量的RT-PCRにて比較したプロット図

【図7】本発明の方法を用いて得た標準RNAと、オンカラムDNase消化と共に本発明の方法を用いて得たRNAを定量的RT-PCRで比較したプロット図

【図8】種々のスピнкаラム膜から回収したRNA量

【図9】本発明の種々のガラスファイバースピンカラムを用いて種々の哺乳類の組織及び細胞培養物からRNAを単離した結果

40

【図10】植物組織からRNAを単離した結果

【図11】植物組織からRNAを単離した結果

【図12】単離したRNAのバイオアナライザ画像

【符号の説明】

【0153】

10 予備濾過スピнкаラム

12 ファイバースピンカラム材

14、26、40 固定リング

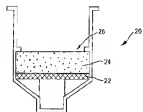
16、22、42 フリット

20 スピнкаラム

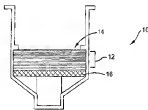
50

- 2 4 シリコンカーバイドウイスカ
- 3 0 単離カラム
- 3 2 注入口
- 3 4 排出口
- 3 6 チャンバ
- 3 8 ポリマー膜

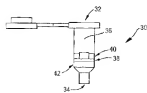
【図 1】



【図 2】



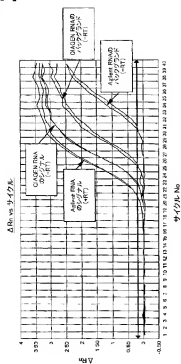
【図 3】



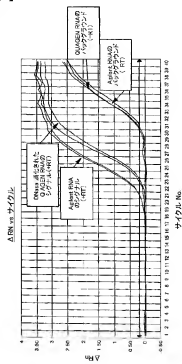
【図 4】



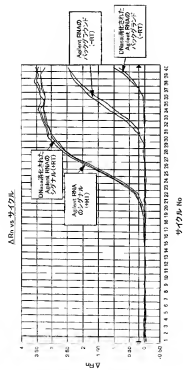
【 図 5 】



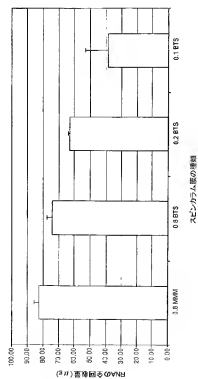
【 図 6 】



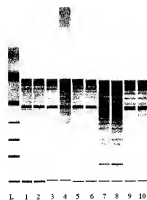
【 図 7 】



【 図 8 】



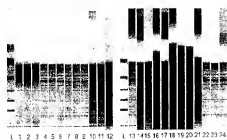
【図 9】



【図 11】



【図 10】



【図 12】





---

フロントページの続き

(72) 発明者 クラウディア・エイ・ロビンス

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 9 , ウィルミントン, サウス・ロード・ 1 1 2

(72) 発明者 ジョン・リンク

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 8 , ウィルミントン, バーバリー・ドライブ・ 2 2 6

(72) 発明者 バリー・イー・ボイエス

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 8 , ウィルミントン, ワーズワース・ドライブ・ 1 1 9

(72) 発明者 ローンダ・テイラー

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 9 7 7 , スミルナ, クリスティン・コート・ 1 3

F ターム(参考) 4E024 AA11 AA20 CA11 HA08 HA11

4E029 AA09 AA21 AA23 BB20 CC02 CC11 HA05